

Aus dem Pathologischen Institut  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. med. Thomas Kirchner  
ehemaliger Vorstand: Prof. Dr. med. Udo Löhrs

**Analyse des AKT1-Onkogens an Granulosazelltumoren des Ovars:  
Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungen mit gen-spezifischer DNA-Probe  
an 29 Granulosazelltumoren**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von

Christina Horvath

aus

München

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:.....Prof. Dr. med. Udo Löhrs/ PD Dr. med. Doris Mayr

Mitberichterstatter:.....Prof. Dr. med. Wolfgang Janni, PD Dr. med. Olivier Gires

Mitbetreuung durch den promovierten  
und habilitierten Mitarbeiter:.....PD Dr. med. Doris Mayr

Dekan:.....Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung:.....17.04.2008

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I. EINLEITUNG.....</b>	<b>6</b>
<b>1. Einführung.....</b>	<b>6</b>
<b>2. Granulosazelltumoren.....</b>	<b>7</b>
2.1. Zur Begriffserklärung .....	7
2.2. Epidemiologie und Risikofaktoren.....	7
2.3. Klinik und Diagnose.....	8
2.4. Pathologische und histopathologische Merkmale.....	8
2.5. Therapie.....	10
2.6. Rezidiv.....	13
2.7. Tumormarker.....	13
2.8. Prognose und Prognosefaktoren.....	14
2.9. Molekularpathologie.....	16
2.9.1. Allgemeines zu Tumorgenese.....	16
2.9.2. Molekulargenetische Untersuchungen an Granulosazell- tumoren.....	16
<b>3. AKT1 und PKB<math>\alpha</math>.....</b>	<b>19</b>
3.1. Zur Begriffserklärung.....	19
3.2. Historisches und Allgemeines .....	20
3.3. Biochemische Eigenschaften und Molekularer Aufbau der PKB $\alpha$ .....	20
3.4. Aktivierung von AKT1/PKB $\alpha$ .....	21
3.5. Faktoren, welche die Aktivität von AKT1 beeinflussen.....	21
3.6. Physiologische Funktionen von AKT1/PKB $\alpha$ Aktivierung / Zielmoleküle des PI3K/AKT1Signalweg.....	22
3.6.1. Apoptose.....	22
3.6.2. Zellzyklusprogression und Proliferation.....	23
<b>4. Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit.....</b>	<b>24</b>

## II. MATERIAL UND METHODEN.....25

1. Material.....	25
2. Prinzip und Methodik der Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung (FISH).....	29
3. Herstellung der Proben-DNA (Sonden-DNA).....	30
3.1. Prinzip der Sondenherstellung.....	30
3.2. Auswahl des Bakterienklons.....	30
3.3. Vermehrung und Isolierung der BAC-DNA.....	30
3.3.1. Anlegen der E.coli-Kultur.....	30
3.3.2. Isolierung der BAC-DNA aus E.coli mittels NucleoBond BAC 100 Kit.....	30
3.3.2.1. Disolation der BAC-DNA mittels alkalischer Zelllyse.....	30
3.3.2.2. Aufreinigen der BAC-DNA über Anionenaustausch.....	31
3.4. Überprüfen der BAC-DNA.....	31
3.4.1. DNA-Konzentrationsbestimmung am Photometer.....	31
3.4.2. Agarosegelelektrophorese der DNA.....	32
3.5. Sequenzieren der DNA.....	34
3.6. Markieren der Sonden-DNA mittels Nick-Translation.....	35
4. Vorbereitung der Präparate zur Hybridisierung.....	36
5. <i>In situ</i> -Hybridisierung.....	38
5.1. Vorbereitung der Sonden-DNA-Mischung und Auftragen der Probe.....	38
5.2. Duale Denaturierung der Ziel-DNA und DIG-markierter Proben-DNA und Hybridisierung.....	38
5.3. Stringentes Waschen und Nachweis der Hybridisierung.....	38

6. Auswertung.....	40
7. Statistische Verfahren.....	40
<b>III. ERGEBNISSE.....</b>	<b>42</b>
1. Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung.....	42
2. Korrelationen der FISH-Ergebnisse zur CGH sowie zu bekannten Prognosefaktoren und zum Überleben.....	51
<b>IV. DISKUSSION.....</b>	<b>60</b>
<b>V. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>70</b>
<b>VI. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>73</b>
<b>VII. ANHANG zu Kapitel II. MATERIAL UND METHODEN VERWENDETE REAGENTIEN, CHEMIKALIEN und GERÄTE.....</b>	<b>91</b>
<b>VIII. LEBENSLAUF.....</b>	<b>94</b>
<b>XI. DANKSAGUNG.....</b>	<b>95</b>

## **I. EINLEITUNG**

### **1. Einführung**

In den Industriestaaten stellt das Ovarialkarzinom die zweithäufigste Neoplasie des weiblichen Genitaltrakts dar [20] und zählt zu den sechs häufigsten Malignomen der Frau überhaupt [39].

Da die Symptome der Patientinnen meist unspezifisch sind und keine effektiven Früherkennungsmaßnahmen zur Verfügung stehen [20], werden nach wie vor 70% aller ovariellen Karzinome erst im metastasierten Spätstadium FIGO III und IV diagnostiziert [39].

Daher hat das Ovarialkarzinom von allen genitalen Neoplasien den ungünstigsten Verlauf mit der höchsten Letalität [39].

Anders stellt sich die Situation für die seltenen Granulosazelltumoren des Ovars dar.

Aufgrund ihrer hormonalen Aktivität werden diese bis zu 90% im FIGO [112] Stadium I entdeckt [115, 97] und haben somit nach chirurgischer Resektion eine exzellente Prognose [126, 100].

Nichts desto trotz zeichnen sie sich durch eine unvorhersagbare Dignität [115] mit einer nicht voraussehbaren Rezidivneigung [92] auch erst Jahrzehnte nach der Erstdiagnose aus [92, 105, 97].

Im Hinblick auf das unberechenbare Tumorverhalten, welches mit keinen histologischen Parametern korreliert [115], herrscht auch Uneinigkeit über den Nutzen postoperativer Therapiemaßnahmen [92].

Die Identifikation von genetischen und biologischen Veränderungen die dem Tumorverhalten der Granulosazelltumoren zugrunde liegen [54], analog zum Her-2/neu Rezeptorstatus des Mammakarzinoms [101], wäre von großem diagnostischen und therapeutischem Interesse, um eine Optimierung der Vorgehensweise bei dieser seltenen Tumorart zu erfahren.

## **2. Granulosazelltumoren**

### **2.1. Zur Begriffserklärung**

Granulosazelltumoren sind sehr seltene Tumoren des Ovars. Erstmals wurden sie 1859 von Rokitansky beschrieben [120]. Ihre Ätiologie sowie ihre Dignität sind dennoch bis heute ungeklärt [97]. Sie stellen ca. 2-5 % aller ovariellen Neoplasien dar. An Hand klinischer sowie histopathologischer Merkmale unterscheidet man eine adulte von einer raren juvenilen Form [126, 115].

Sie stammen von dem hormonaktiven, für die Östrogenproduktion zuständigen Teil des Ovarialstromas, den Granulosazellen ab [126, 115] und gehören zur Gruppe der Keimstrangstromatumoren, zu denen man Tumoren mit embryonaler Herkunft aus dem Keimstrang oder gonadalen Stroma zählt. Hierzu zählt man die Thekazelltumoren, Sertolizelltumoren, Leydigzelltumoren, fibroblastische Tumoren und verschiedene Mischformen [127, 148]. Mit 70 % bis 95%, je nach Literaturangaben, machen die Granulosazelltumoren den weitaus größten Anteil innerhalb dieser Gruppe aus [126, 25, 16, 17, 115].

### **2.2. Epidemiologie und Risikofaktoren**

Granulosazelltumoren können in jedem Alter auftreten, gehäuft jedoch bei Frauen in der frühen postmenopausalen Phase, jenseits des 40. Lebensjahrs. Der Altersmedian der Erstdiagnose liegt bei ca. 50 Jahren [115, 48, 42, 107, 97, 124, 104]. Die Inzidenz variiert je nach Literaturangabe in den entwickelten Ländern zwischen 0,4 und 1,7 pro 100.000 Einwohner [107, 97, 17, 42, 48].

Risikofaktoren die zur Entwicklung eines Granulosazelltumors führen sind derzeit nicht bekannt. Insbesondere scheint eine vererbare Prädisposition wie bei den Ovarialkarzinomen nicht zu existieren. So ist eine Keimbahnmutation des BCRA1 oder BCRA2-Gens nicht mit einem höheren Risiko für die Entstehung eines Granulosazelltumors assoziiert [113, 126]. Zeitpunkt der Menarche, menopausaler Status, Schwangerschaften, die Einnahme oraler Kontrazeptiva oder fertilitätssteigernder Hormone scheinen ebenfalls nicht im Zusammenhang mit der Entwicklung von Granulosazelltumoren zu stehen [145, 136].

### **2.3. Klinik und Diagnose**

Bis zu 80% aller Granulosazelltumoren sind endokrinologisch aktiv und produzieren neben anderen Hormonen hauptsächlich Östrogen [115, 8]. Die Auswirkungen dieser tumorbedingten Östrogenproduktion stehen im Vordergrund der Klinik und führen meist zur Diagnosestellung bereits im frühen, noch auf das Ovar beschränkten Tumorstadium [115, 124].

Die am häufigsten von Granulosazelltumoren betroffenen postmenopausalen Frauen stellen sich mit vaginalen Blutungen vor, die Folge einer östrogenbedingten Endometriumshyperplasie sind, die in einigen Fällen auch mit einem endometrialen Adenokarzinom assoziiert sein kann [126, 48, 42, 61, 26].

Bei prämenopausalen Frauen stellen Menstruationsunregelmäßigkeiten, Menorrhagien und seltener sekundäre Amenorrhoeen die Initialsymptome dar [126, 48, 42, 97, 35]. Sind Mädchen vor der Menarche betroffen, so fallen diese meist durch eine vorzeitige sexuelle Entwicklung im Rahmen einer Pseudopubertas praecox auf [48, 35, 148].

Seltene Fälle bei denen Infertilität, als wahrscheinliche Folge der unkontrollierten Inhibinsekretion (siehe Kapitel 2.7. Tumormarker), oder aber androgene Veränderungen wie Virilisierung und Hirsutismus zur Diagnosestellung führen, sind beschrieben worden [145, 91, 58]. Auch unspezifische abdominalen Beschwerden, als Folge der oft großen Tumormasse können Symptome eines Granulosazelltumors sein [107, 35]. Granulosazelltumoren können auch hämorrhagisch rupturieren und somit unter dem klinischen Bild eines akuten Abdomens erstmals auffallen [48, 26].

### **2.4. Pathologische und histopathologische Merkmale**

Mehr als 90% aller Granulosazelltumoren betreffen nur ein Ovar [115, 100]. Makroskopisch imponieren Granulosazelltumoren als meist solide, vereinzelt auch zystisch aufgelockerte Tumoren von mäßig fester Konsistenz [115]. Die Schnittflächen weisen einen gelblichen Aspekt auf, der auf die Anwesenheit neutraler Fette als Zeichen der Steroidhormonproduktion zurückzuführen ist [115].

Mikroskopisch stehen beim adulten Typ die kleinen, zytoplasmaarmen, blassen, rundlich oder ovalen Granulosazellen mit der charakteristischen kaffeebohnenartiger Einkerbung der gleichmäßig großen Nuclei im Vordergrund [115].



Im Stroma finden sich fast regelhaft Theka-Zellformationen [115], selten auch Sertoli oder Leydig-Zellen [92], wobei die Mischung verschiedener Zellkompartimente die Fähigkeit der Tumoren zur Sekretion unterschiedlicher Hormone widerspiegelt [115].

Sogenannte Call-Exner-Körperchen - mit meist eosinophilen zellulären Debris gefüllte Kavitäten, die von hochdifferenzierten Granulosazellen umgeben sind - sind pathognomisch für die Granulosazelltumoren, und kommen in etwa 30- 60% aller Fälle vor [48, 17, 148, 115].

Die Tumorzellanordnung ist sehr variabel, wobei mikrofollikuläre, makrofollikuläre, trabekuläre, insuläre oder sarkomatoid diffuse Varianten beschrieben werden [115, 148]. Der am häufigsten vorkommende Wachstumstyp, der mikrofollikuläre Typ zeigt ein rosettenförmiges Muster um viele Call-Exner-Körperchen. Luteinisierte Zellen sind in unterschiedlichem Ausmaß eingestreut und unregelmäßige Bindegewebsstränge septieren die Läsionen. Der makrofollikuläre Typ unterscheidet sich vom mikrofollikulären Typ lediglich durch größere Call-Exner-Körperchen, die als große eosinophile mit Sekret und Zellschutt gefüllte Zysten imponieren. Im trabekulären Typ sind die Granulosatumorzellen in anastomisierenden Bändern oder schmalen Tubuli angeordnet und zeigen peripher eine variable Palisadenstellung. Beim insulären Muster imponieren gut begrenzte rundlich angeordnete Zellkomplexe, die Ähnlichkeit zu insulären Karzinoiden aufweisen können [115].

Schwierig zu diagnostizieren ist der sarkomatoid diffuse Granulosazelltumor. Er besteht aus dichtliegenden, faszikulär angeordneten, teils oval, teils abgeflachten Zellformationen, die nur noch entfernt an Granulosazellen erinnern. Mitosen kommen bei diesem Typ häufig vor. Die Differentialdiagnose zu einem anaplastischen Karzinom kann sich für diesen Tumortyp besonders schwierig gestalten [115]. In der mikroskopischen Differentialdiagnose zu undifferenzierten Karzinomen muss das typische Erscheinungsbild der Zellkerne der Granulosazelltumoren – uniform, blass und eingekerbt - berücksichtigt werden [148].

Bei unklarer Histologie kann die Immunhistochemie hilfreich sein, da sich Granulosazelltumoren, gegensätzlich zu den Karzinomen, negativ für epitheliale Membranantigene und positiv für Inhibin färben [70].

Bei der seltenen juvenilen Form (ca 5% aller Fälle), die bei Kindern und Frauen bis zur 3. Lebensdekade auftritt, haben die Zellen einen geringeren Differenzierungsgrad mit

Zellkernen, die einen höheren Chromatingehalt, eine höhere Mitoserate und öfter Atypien aufweisen, wobei die typische Einkerbung fehlt [148, 135].

Für die adulte, als auch für die juvenile Form gilt, daß das histologische Bild nicht unbedingt mit der Klinik korreliert [115, 53, 92 ] und somit aus der Histomorphologie keine Schlüsse bezüglich der Tumordignität und des Tumoverhaltens gezogen werden können.

## **2.5. Therapie**

Da die herkömmlichen histologischen Parameter keine definitiven Aussagen über die Tumordignität erlauben, muß in allen Fällen eines Granulosazelltumors mit einer malignen Potenz gerechnet werden [115]. So gelten beim Granulosazelltumor die gleichen onkochirurgischen Prinzipien wie bei einem epithelialen Ovarialkarzinom [126]. Tabelle. I.1. gibt einen Überblick über die derzeit gültigen Kriterien der Tumorklassifikation für das Ovarialkarzinom nach der International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO), nach denen auch die Granulosazelltumoren eingeteilt werden [112].

Im Stadium I wird eine Hysterektomie mit bilateraler Salpingoophorektomie (Adnektomie) und partieller Omentektomie mit histologischer Begutachtung paraortaler und pelviner Lymphknoten, sowie eine Peritonealbiopsie und eine zytologische Beurteilung der Peritonealflüssigkeit durchgeführt. Eine intraoperative Inspektion des oberen Abdomens, insbesondere des Omentums, der Diaphragmaunterseite sowie der parakolischen Areale und der Darmserosa sollte erfolgen [126, 33]. Bei Kinderwunsch kann im Stadium Ia, nach Durchführung einer Endometriumsbiopsie zum Ausschluss einer malignen Transformation, eine unilaterale Adnektomie gerechtfertigt sein. Da Granulosazelltumoren in 2-8% bilateral auftreten, sollte jedoch nach Abschließen der Familienplanung ein erneutes chirurgisches Vorgehen in Erwägung gezogen werden [48, 42, 17, 124, 25]. Eine adjuvante Therapie wird im Stadium I allgemein nicht empfohlen [15, 16, 33, 42, 48, 124].

Für die weiter fortgeschrittenen Tumoren (Stadien FIGO II-IV) wird nach der möglichst vollständigen Tumorresektion, die Durchführung einer postoperativen Chemotherapie mit platinhaltigen Zytostatika angeraten[ 124, 34, 150]. Der Nutzen einer Radiotherapie wird kontrovers diskutiert. So haben Savage et al., Wolf et al. und

Lee et al. eine Verlängerung der rezidivfreien Überlebenszeit durch Radiotherapie beobachtet [124, 146, 93]. Andere Studien hingegen berichten von keinem verwertbaren Vorteil durch eine Radiotherapie [42, 107, 97]. Trotz des variablen Ansprechens ist die Radiatio heute meist Bestandteil der Therapie von Rezidiven und fortgeschrittenen Tumoren [54]. In der Literatur existieren Berichte über erfolgreiche Hormontherapien mit Gonadotropin-Releasing-Hormon-Agonisten nach erfolgloser operativer und zytostatischer Therapie [99, 45 ]. Aber auch über Therapien mit Progesteron oder Antiöstrogenen wird berichtet [57, 22]. Angesicht der kleinen Fallzahlen sowie konträren Meinungen anderer Autoren wird der Hormontherapie von Granulosazelltumoren jedoch derzeit keine Bedeutung beigemessen [124, 33].

**Tabelle I.1. Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms [112]**

<b>FIGO</b>	<b>TNM</b>	<b>Befundsituation</b>
<b>I</b>	<b>T1</b>	<b>Karzinom auf die Ovarien begrenzt</b>
Ia	T1a	nur ein Ovar befallen, kein Aszites, kein Tumor auf der Oberfläche, Kapsel intakt
Ib	T1b	beide Ovarien befallen, kein Aszites, kein Tumor auf der Oberfläche, Kapsel intakt
Ic	T1c	wie Stadium Ia oder Ib, aber mit Tumor auf der Oberfläche eines/beider Ovarien oder mit Kapselruptur oder mit positivem Aszites oder positiver Peritoneal-spülung
<b>II</b>	<b>T2</b>	<b>Karzinom eines oder beider Ovarien mit Ausdehnung im kleinen Becken</b>
IIa	T2a	Ausdehnung/Metastasen auf Uterus oder Tuben
IIb	T2b	Ausdehnung auf andere Gewebe im kleinen Becken
IIc	T2c	wie Stadium IIa oder IIb, aber mit Tumor auf der Oberfläche eines/beider Ovarien oder mit Kapselruptur oder mit positivem Aszites oder positiver Peritoneal-spülung
<b>III</b>	<b>T3 und/oder N1</b>	<b>Karzinom mit intraperitonealer (auch nur histologisch nachweisbarer) Metastasierung außerhalb des kleinen Beckens und/oder positiven retroperitonealen oder inguinalen Knoten, Leberkapselmetastasen</b>
IIIa	T3a	Tumor makroskopisch auf das kleine Becken begrenzt ohne retroperitonealen oder inguinalen Knoten, aber mit histologisch gesicherter Metastasierung in viszeralem oder parietalem Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens
IIIb	T3b	Karzinom eines oder beider Ovarien mit histologisch gesicherten intraabdominalen Metastasen, deren Größe 2cm nicht überschreitet, keine retroperitonealen Knoten
IIIc	T3c und/oder N1	abdominale Metastasen > 2 cm im Durchmesser und/oder retroperitoneale oder inguinale Knoten

## **2.6. Rezidiv**

Je nach Literatur werden Rezidivraten zwischen 9% und 40% angegeben [42, 97, 104, 53, 71, 131, 35], wobei der Mittelwert der Rezidivraten größerer Studien an Patientinnen mit Granulosazelltumoren bei 20-30% liegt [92].

Am häufigsten treten die Rezidive durchschnittlich 4 bis 6 Jahre nach der Erstdiagnose auf [42, 50], wobei zirka 17% jedoch erst nach 10 Jahren oder später rezidivieren [35]. Spätrezidive bis zu mehreren Jahrzehnten nach der Erstdiagnose [105] gelten als charakteristisch für diese Neoplasie und machen die Notwendigkeit einer langen Nachsorge sowie die Hoffnung in die Identifikation neuer Tumormarker deutlich [42, 71, 97]. Die Prognose in der Rezidivsituation ist mit durchschnittlichen Überlebenszeiten von ca. 5 Jahren schlecht [42].

Rezidive der juvenilen Form kommen sehr viel seltener vor. Wenn sie eintreten, dann zumeist innerhalb des ersten Jahres nach der Initialdiagnose, wobei diese mit einem therapierefraktärem, innerhalb 13- 16 Monaten zum Tode führenden Verlauf assoziiert sind [149]. Für die Rezidivsituation existieren keine generell gültigen Therapieschemata, jedoch scheint eine chirurgische Intervention gefolgt von einer postoperativen Chemotherapie und einer Radiatio das Überleben zu verlängern [34, 57, 150].

## **2.7. Tumormarker**

Aufgrund der Häufigkeit unvorhersagbarer Spätrezidive ist eine lange posttherapeutische Verlaufskontrolle obligat [42, 71, 97]. Die Existenz sensitiver Tumormarker wären hierfür von großem Nutzen.

CA-125 findet bei epithelialen Karzinomen des Ovars als nützlicher Tumormarker Anwendung [73]. Für die Granulosazelltumoren spielt es jedoch keine Rolle [77].

Mehr als 80% aller Granulosazelltumoren produzieren Östrogen [115, 8]. Der Östrogenspiegel eignet sich somit zum Monitoring des Status einiger Patientinnen. Zur posttherapeutischen Langzeitverlaufskontrolle eignet er sich jedoch weniger, da keine konstante Korrelation zwischen Östrogenpiegel und Tumorprogression nachzuweisen ist, und Granulosazelltumoren in der Rezidivsituation oftmals über keine nachweisbare Hormonsekretion verfügen. Selbes gilt für Testosteron als potentieller Tumormarker bei den Androgen-produzierenden Tumoren [91, 116].

Inhibin ist ein heterodimeres Polypeptid, welches von normalen follikulären Granulosazellen produziert wird und als negatives Feedback-Regulationshormon zu dem Hypophysenvorderlappenhormon FSH (Follicle Stimulating Hormon) fungiert. Die Inhibinsekretion wird durch FSH und LH (Luteinizing Hormone) stimuliert und tritt vornehmlich in der follikulären Phase des Menstruationszyklus auf. Das Ovar und die Plazenta schwangerer Frauen scheinen die einzigen Produktionsstätten zu sein. Somit sollte der Inhibinspiegel postmenopausaler Frauen niedrig sein [126]. Granulosazelltumorzellen produzieren auch Inhibin, welches im Serum betroffener Frauen nachweisbar ist [91, 19, 77]. Mehrere Studien berichten über erhöhte Inhibinspiegel bei post- als auch prämenopausalen Patientinnen mit Granulosazelltumoren, die gut mit der Tumorlast korrelierten, oder aber bereits geraume Zeit vor der klinischen Rezidivmanifestation nachzuweisen waren [68, 19, 77]. So stellt Inhibin den derzeit zuverlässigsten Marker dar, der ein eingetretenes Tumorrezidiv identifizieren kann [68, 19, 77].

Biologische Marker die Aussagen zum Zeitpunkt oder der Wahrscheinlichkeit eines Rezidiveintrittes machen könnten, sind bislang jedoch nicht bekannt [54, 100].

## **2.8 Prognose und Prognosefaktoren**

Trotz der herrschenden Unklarheit bezüglich der Dignität von Granulosazelltumoren [92] zeichnet sich die überwiegende Mehrzahl dieser zu 90% bereits im FIGO Stadium I diagnostizierten Tumoren durch eine lange rezidivlose Überlebenszeit aus [115, 97]. Die 5-Jahres- und 10-Jahresüberlebensraten für die jeweiligen Tumorstadien sind in Tabelle I.2 dargestellt [126].

Die Tabelle veranschaulicht das Auftreten von Spätrezidiven mit schlechter Prognose sowie das eingeschränkte Überleben für die höheren Stadien [126] (siehe Tabelle I.2. Überlebensraten).

**Tabelle I.2. Überlebensraten [126]**

FIGO-Tumorstadium	5-Jahresüberlebensrate (%)	10-Jahresüberlebensrate (%)
<b>I</b>	90-100 %	84-95 %
<b>II</b>	55-75 %	50-65 %
<b>III und IV</b>	22-50 %	17-33 %

Im Vergleich zu anderen Neoplasien des Ovars ist die Gesamtüberlebensrate sehr gut und daher wird den Granulosazelltumoren auch ein semi-maligner Charakter mit low-grade Malignität eingeräumt [48, 109]. Nichts desto trotz ist der Verlauf einiger Fälle den fortgeschrittenen ovariellen Karzinomen sehr ähnlich [53].

Um maligne Verläufe vorhersagen zu können und so auch leichter Entscheidungen bezüglich postoperativer Therapiemaßnahmen fällen zu können, wird an der Identifizierung prognostischer Faktoren intensiv geforscht [53]. Dennoch ist derzeit nur das Tumorstadium ein zuverlässiger prognostischer Faktor, der sowohl mit dem Überleben als auch der Rezidivwahrscheinlichkeit korreliert [48, 17, 42, 107, 97, 104]. Andere Information wie Tumorgöße [131, 48, 42], Tumorrupatur [17], Wachstumsmuster [115, 53], mitotischer Index und Anzahl zellulärer Atypien [97, 104, 53, 131, 17] sowie Alter der Patientinnen [131, 48] werden bezüglich ihrer prognostischen Bedeutung in der Literatur kontrovers diskutiert.

Aufgrund der Seltenheit der Granulosazelltumoren und der damit verbundenen kleinen Fallzahlen der meisten Studien ist es auch sehr schwierig die prognostische Signifikanz dieser Parameter zu definieren [126].

Die Kenntnis von Faktoren, die unabhängig vom Tumorstadium zuverlässig für oder gegen die Notwendigkeit weiterer aggressiver Therapiemaßnahmen sprechen, würden einen großen Fortschritt in der Historie der Granulosazelltumoren darstellen. In jüngster Zeit werden diesbezüglich die meisten Erwartungen in die Entdeckung molekularbiologischer Merkmale gesetzt [53].

## **2.9.Molekularpathologie**

### **2.9.1. Allgemeines zur Tumorgenese**

Die wesentlichste Eigenschaft von Tumorzellen in einem Organismus ist der Verlust ihrer Teilungs- und Differenzierungskontrolle. Allgemein wird angenommen, daß über einen Mehrstufenprozeß auf genetischer Ebene eine Normalzelle durch den Verlust ihrer genetischen Stabilität maligne transformiert [63, 64].

Jegliche Krebszelle stellt somit den Phänotyp ihrer genetischen Pathologie dar, die ihr malignitätstypische Eigenschaften verleiht, wie sich zum Beispiel eigene mitotische Signale zu setzen, sich exogenen wachstumshemmenden Signalen zu widersetzen, sich dem natürlichen Zelltod zu entziehen, ungehemmt zu proliferieren und in ein immortalen Zustand überzugehen, eine Vaskularisation (Angiogenese) des Tumorgewebes zu induzieren und letztendlich im fortgeschrittenen Stadium invasiv zu wachsen und zu metastasieren [13, 63, 64, 67].

Verschiedene Kategorien von Zellgenen, die entweder direkt oder indirekt an den Regulationskreisläufen von Zellzyklus, Zelldifferenzierung und Zellproliferation beteiligt sind, spielen bei der malignen Transformation eine zentrale Rolle, so zum Beispiel die Proto-Onkogene oder die Tumorsuppressorgene. Mutationen ihrer Allele oder aber epigenetische Veränderungen wie DNA- De- oder Methylierungen führen zu Funktions- oder Aktivitätsveränderungen des Gens und so zu Unterbrechungen und Störungen der physiologischen Abläufe dieser Regulationskreisläufe und Signalkaskaden in der Zelle [67, 63, 64].

Die Identifikation der genetischen Veränderungen spezifischer Tumorzellen sowie den damit veränderten Transkriptions- und Expressionsprodukten, könnte somit einerseits frühe diagnostische und prognostische Marker liefern, aber auch molekulare Angriffspunkte für neue Tumortheraeutika ermöglichen [63,64].

### **2.9.2. Molekulargenetische Untersuchungen an Granulosazeltumoren**

Molekulargenetischen Untersuchungen die bei Granulosazelltumoren durchgeführt wurden, haben eine Vielzahl zytogenetischer Abnormalitäten aufgezeigt. Biologische Faktoren, die das Tumorverhalten und somit die Prognose beeinflussen, sind jedoch bis heute noch weitgehend unbekannt [53, 100].

Mikrosatelliteninstabilität (MSI),Verlust der Heterozygotie (LOH) sowie multiple chromosomale Instabilitäten, struktureller und numerischer Art beschrieb Dhillon et



al. als häufige Merkmale von Granulosazelltumoren, aber für keine dieser Veränderungen konnte er eine prognostische oder klinische Relevanz ermitteln [37].

p53, ein Tumorsuppressorgen, dessen Bedeutung für die Tumorgenese und Tumorprogression zahlreicher Malignome, unter anderem auch für das epitheliale Ovarialkarzinom beschrieben ist, scheint für das Verhalten der Granulosazelltumoren keine Rolle zu spielen [2, 87, 100, 84]. Mutationen des Gens konnten in Granulosazelltumoren nicht nachgewiesen werden [84]. Zwar haben einige Autoren einen Zusammenhang zwischen der p53-Überexpression und dem Überleben diskutiert [56], doch in anderen Studien war diese in den untersuchten Granulosazelltumoren gar nicht nachweisbar [53], oder zeigte keine Korrelation zu klinischen Parametern [100].

King et al. führte an 40 Granulosazelltumoren immunhistochemische Untersuchungen mit c-myc, p21-ras, c-erb B2, p53 und Ki-67 durch. Lediglich für die Überexpression des proliferations-assoziierten Antigen Ki-67 postulierte er eine schlechtere Prognose [87]. Mayr et al. konnten dies allerdings in ihrer Arbeit nicht bestätigen [100].

Eine Beteiligung der ras- und B-raf-Gene an der Entwicklung von Granulosazelltumoren schlossen Jamieson et al. in ihrer Studie weitgehend aus [76].

Da bei zahlreichen Granulosazelltumoren Östrogenrezeptoren nachweisbar waren und Therapieversuche mit Hormonen und Hormon-Agonisten/Antagonisten erfolgversprechend verliefen, steht auch zur Debatte, ob der Östrogenrezeptorstatus ähnlich dem Mammakarzinom zur Prognosebestimmung herangezogen werden könnte [145, 45, 27, 54]. Die pathologische Signifikanz der Östrogenrezeptorexpression in Granulosazelltumoren ist derzeit jedoch noch unklar [54].

Bei epithelialen Ovarialneoplasien ist ein nicht diploider Chromosomensatz Ausdruck der genetischen Instabilität, insbesondere eine Aneuploidität spricht für einen aggressiveren Tumortyp mit schlechter Prognose [88, 18, 82, 119]. Untersuchungen der Ploidität der DNA von Granulosazelltumoren mittels Flow-Cytometrie und Image-Cytometrie zeigten für mehr als 80% der untersuchten Tumoren einen normalen diploiden Chromosomensatz [139, 65, 59, 133, 100].

Einige Studien räumten dabei diploiden Granulosazelltumoren einen prognostischen Vorteil ein [88, 31, 62, 74, 121]. Jüngere Untersuchungen widerlegten jedoch diese Beobachtung [103, 43, 2, 100] und betonten die geringe Sensitivität der Cytometrie-Methoden zur Aufdeckung quantitativ kleinerer Veränderungen des DNA-Gehaltes

[47, 38] zum Beispiel für Aneuploiditäten (die Vermehrung oder Verminderung des euploiden Chromosomensatzes um einzelne Chromosomen).

Sensitivere Methoden haben an aneuploiden zytogenetischen Abweichungen in der Erbinformation von Granulosazelltumoren hauptsächlich numerische Chromosomenaberrationen aufgewiesen. Trisomie 12, Trisomie 14 und Monosomie 22 werden am häufigsten erwähnt [46, 65, 140, 100, 37], wobei die Trisomie 12 mit dem juvenilen Typ des Granulosazelltumors assoziiert wird [140, 95] und die Monosomie 22 und die Trisomie 14 überdurchschnittlich oft in den adulten Formen vorgefunden wird [140, 95, 100].

Im Vorfeld zu dieser Arbeit konnten Mayr et al. über Komparative genomische Hybridisierung (CGH) an 20 Granulosazelltumoren in 25% der Tumoren einen Zugewinn genetischen Materials am langen q-Arm des Chromosom 14 feststellen [100]. Die CGH stellt eine Screening-Methode zur Aufdeckung chromosomaler Abberationen in Tumorgewebe dar [81], dessen Prinzip auf dem quantitativen Vergleich der Tumor-DNA mit einer normalen Referenz-DNA beruht. Die zu untersuchende (Test)-DNA und die normale (Kontroll)-DNA werden mit unterschiedlichen Fluorochromen markiert und zu gleichen Teilen zur Hybridisierung auf normale Metaphasenchromosomen eingesetzt [41].

Enthält die zu untersuchende Tumor-DNA zusätzliches chromosomales Material (Trisomien, Tetrasomien, Duplikate, etc.), oder ist Material verlorengegangen (Monosomien, Deletionen, etc.) ergibt sich eine quantitative Differenz entsprechend der Über- oder Unterrepräsentation von Chromosomensequenzen des veränderten Genoms [118], die mittels digitaler Bildanalyseverfahren in Bezug auf die Fluoreszenzintensitäten der jeweiligen Markierungen quantifiziert wird [40]. Dabei erfolgt die Hybridisierung auf Metaphasenchromosome und daher ist ihr Auflösungsvermögen durch die Kondensation dieser Referenz-Chromosomen limitiert. Die Sensitivität dieser Methode schwankt in Abhängigkeit der Kopienzahl der veränderten Region und liegt für den Zugewinn von genetischen Material im Bereich von 2Mb bis zu 50 kb bei hochamplifizierten Bereichen [117].

Diese Methode kann demnach nur größere Veränderungen der DNA-Mengen darstellen, eben Verlust oder Gewinn ganzer Chromosomen bzw. Chromosomenabschnitte bzw hochgradig amplifizierte oder deletierte Genregionen [118, 117, 81].

### **3. Das AKT1 Proto-Onkogen und die Proteinkinase B $\alpha$**

#### **3.1. Zur Begriffserklärung**

Das AKT1-Gen ist ein Proto-Onkogen, das für die Proteinkinase PKB $\alpha$  kodiert.

Proto-Onkogene sind Zellgene, welche für Proteine, die in verschiedenster Weise an den Zellfunktionen wie Zellwachstumsregulation, Proliferation, Differenzierung und Zellüberleben beteiligt sind, kodieren [101, 67].

Zu den molekularen Mechanismen, die die Funktion eines Proto-Onkogens in die eines transformierenden Onkogens verwandeln können, gehören unter anderem die Amplifikation, also die Erhöhung der Kopienzahl des kodierenden Gens, der Austausch eines inaktiven Promoters mit einem aktiven, eine Genfusion durch chromosomale Translokationen, Insertionen und Veränderungen in der Basenabfolge (Punktmutationen), oder aber epigenetische Veränderungen wie Demethylierungen oder Methylierungen der DNA [128, 63, 64].

Ausgehend von der ursprünglichen Rolle der Proteine bei der Wachstumsregulation, können die bei der Tumorzelle veränderten Proteine an mehreren Stellen der Regulationssysteme (z. B. der Signalübertragung) störend einwirken, indem sie reguläre Wachstumsfaktoren imitieren, Rezeptoren imitieren oder anderweitig in zelluläre Signaltransduktionswege eingreifen (z. B. als vermehrt vorhandene bzw. aktivierte Proteinkinase mit spezifischer Phosphorylisierungsaktivität) [86, 102]. Wichtigste Rolle der Proteinkinasen ist die Signaltransduktion, bei der extrazelluläre Signale über eine Kaskade von Proteinphosphorylierungen und Dephosphorylierungen amplifiziert werden. Die Phosphorylierung von Proteinen ist ein fundamentaler Prozeß in der Regulierung zellulärer Funktionen. Zielproteine, die über eine Phosphorylierung „angeschaltet“ werden, werden über ein koordiniertes Zusammenspiel von Phosphatasen und Kinasen im Ausmaß ihrer Aktivität kontrolliert [86, 102].

Die Funktion der vom AKT1-Gen codierten Proteinkinase PKB $\alpha$ , kann man grob zusammenfassen als Übermittler von Wachstumsfaktorsignalen, Förderer von Zellproliferation und Inhibitor der Apoptose [83, 106].

### 3.2. Historisches und Allgemeines zu AKT1/PKB $\alpha$

Auf der Suche nach neuen Mitgliedern der Proteinkinase A und Proteinkinase C-Familie, entschlüsselten 1991 unabhängig voneinander zwei verschiedene Arbeitsgruppen die cDNA von AKT/PKB.

Aufgrund der hohen Sequenzhomologie zur Serin/Threoninkinasefamilie (PKA/PKC) wurde das neue Gen RAC-PK (Related to A and C- Protein Kinase) genannt bzw. Proteinkinase B (PKB) [32, 7]. Bereits 1987 hatte Staal das gleiche Gen als zelluläres Homolog des viralen v-akt-Onkogens des transformierenden Retrovirus AKT8 isoliert, welches in Mäusen eine Leukämieart auslöst, und c-akt genannt. Durch Klonierung des humanen Homologs wies er eine 20-fache Amplifikation des AKT1-Gens in einem von fünf untersuchten gastralen Adenokarzinomen nach und postulierte damals ohne Kenntnis der Proteinfunktion die Beteiligung von AKT 1 an der Pathogenese einiger menschlicher Neoplasien [128]. Zeitgleich zu den beiden anderen Arbeitsgruppen entschlüsselte auch Staal das Gen [12].

Es existieren 3 Isoformen der Proteinkinase B mit jeweils eigenem Genlocus, (AKT1 und PKB- $\alpha$ , AKT2 und PKB- $\beta$ , AKT3 und PKB- $\gamma$ ) [28, 23]. AKT1 und sein Genprodukt PKB- $\alpha$  ist die in den meisten Geweben und in Fibroblasten von Mausembryos vorherrschende Form und wird ubiquitär in allen Säugetierzellen exprimiert [30, 3, 4]. Mittels *in situ*-Hybridisierung normaler humaner Metaphasechromosomen mit radioaktiven AKT1-Proben konnte Staal das AKT1-Gen beim Menschen auf Chromosom 14q32.3 lokalisieren. Das AKT1-Gen liegt somit proximal dem IgH-Immunglobulin Schwerketten Locus [129].

### 3.3. Biochemische Eigenschaften und Molekularer Aufbau der PKB- $\alpha$

Die Proteinstruktur der PKB- $\alpha$  enthält N-terminal eine Pleckstrin Homology (PH)-Domäne, die den Bindungsort für Phospholipide darstellt. Im Zentrum des Moleküls ist die katalytische Domäne, die das (Threonin)-T308-Codon enthält untergebracht, die eine hohe Verwandtschaft zu den katalytischen Einheiten anderer second-messenger regulierten Kinasen wie die Proteinkinase C oder cAMP-abhängiger Proteinkinasen aufweist. C-terminal liegt die regulatorische Einheit mit dem (Serin)-S473-Codon, die über eine kurze glycinreiche Sequenz mit der katalytischen Untereinheit verbunden ist [143, 111].

### **3.4. Aktivierung von AKT1/PKB- $\alpha$**

Für die physiologische Aktivierung von PKB/AKT ist dessen Bindung an die Zellmembran von entscheidender Bedeutung und erster regulatorischer Schritt in der AKT-Aktivierungskaskade [66].

Dies wird durch die N-terminale PH-Domäne des Proteins vermittelt, die mit membranösen Lipidprodukten wie PIP3(Phosphatidylinositol(3,4,5)Tri-Phosphat), den sogenannten PtdIns, die ihrerseits durch Einwirkung der PI3K (Phosphatidylinositol 3 Kinase) entstehen, Bindungen eingeht, und somit an die Zellmembran transloziert wird [75, 51, 66 141].

Die weitere Aktivierung erfolgt durch Phosphorylierung durch die PDPK1 (3-Prime Phosphoinositide-dependent Kinase-1) und die Serin-473-Kinase an zwei spezifischen Codons, Threonin 308 und Serin 473 [132].

### **3.5. Faktoren, welche die Aktivität von AKT1/PKB $\alpha$ beeinflussen**

Die Proteinkinase B- $\alpha$  ist Zielmolekül der Lipidprodukte der PI3K.

Somit ist die AKT/PKB-Aktivität von der PI3K-Aktivität abhängig. PI3K wiederum wird durch aktivierte Wachstumsfaktoren-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen aktiviert.

Die Stimulation von Zellen mit Wachstumsfaktoren führt zu einer Erhöhung der Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Aktivität der entsprechenden Wachstumsfaktoren-Rezeptoren und in der Folge zu einer erhöhten Aktivität der PI3K. Durch Einwirkung der PI3K phosphorylieren Membranlipide. Diese phosphorylierten Membranlipide (PtdIns, PIP3) binden als „second-messenger“ an die PH- Domäne der PKB und initiieren seine Aktivierung. [106] Zu den Stimuli, die AKT1 über die Aktivierung von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen aktivieren gehören neben dem Wachstumshormon auch PDGF-R (Platelet Derived Growth Factor), Insulin, EGF (Epidermal Growth Factor), bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) und IGF-1(Insulin-like Growth Factor) [24, 36, 49, 89].

Somit stellt AKT1 einen intrazellulären Übermittler der extrazellulären Wachstumsfaktorsignale dar [83].

Die Inaktivierung von AKT1 erfolgt normalerweise durch das Tumorsuppressorprotein PTEN (Phosphatase and Tensin Homologue deleted on chromosome ten).

PTEN ist eine spezifische duale Lipid- und Proteinphosphatase, die unter anderem PIP3, das Phosphorylisierungsprodukt der PI3K dephosphoryliert [130].

Da PIP3 über die Bindung an die PH-Domäne die Membranlozierung von AKT1 und damit seine Aktivierung initiiert [66, 141], agiert PTEN als Inhibitor der AKT1-Aktivität [80]. Whang et al., konnten zeigen, daß eine reduzierte Expression von PTEN mit einer erhöhten AKT1-Aktivität korreliert [144].

### **3.6. Physiologische Funktionen der AKT1/PKB- $\alpha$ Aktivierung/Zielmoleküle des PI3K/AKT1 Signalweg**

Die endgültig aktivierte PKB $\alpha$  phosphoryliert und beeinflusst ihrerseits eine Vielzahl von Proteinen.

Über die Identifikation der PKB $\alpha$ -Substrate sowie ihren Rollen in den Zellvorgängen hat man heute Gewißheit über zellzyklusbeschleunigende und antiapoptotische Funktion von AKT1/PKB $\alpha$  erlangen können. Somit kann man allgemein als Konsequenz der AKT1/PKB $\alpha$ -Aktivierungskaskade von zellüberleben- und proliferationsfördernden Vorgängen ausgehen, die durch verschiedenste Störungen innerhalb dieser, zum phänotypischen Verhalten von Krebszellen beitragen können [106].

#### **3.6.1. Apoptose**

Den Apoptoseinhibierenden Effekt erzielt die PKB einerseits durch die Beeinflussung von Transkriptionsfaktoren, welche die Expression von pro- oder antiapoptotisch wirkender Gene regulieren, andererseits durch die direkte Phosphorylierung von Schlüsselenzymen der Apoptosekaskade [106].

So phosphoryliert AKT1/PKB beispielsweise Transkriptionsfaktoren der FORKHEAD-Familie (FKHR, FKHL1, AFX) und inaktiviert deren Expressionsförderung auf proapoptotische Gene wie Fas-L, IGFBP1 und Bim [106, 54].

Transkriptionsfaktoren zellüberlebensfördernder Gene wie NF- $\kappa$ B hingegen werden durch AKT1/PKB $\alpha$  aktiviert [106].

Die terminalen Vorgänge der Apoptosekaskade beinhalten die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom c und die Aktivierung der Caspasekaskade, die zum endgültigen Zelltod führt. Procaspase 9 stellt die Initiatorcaspase der Caspasekaskade dar. Die Procaspase 9 wird direkt von AKT1/PKB $\alpha$  phosphoryliert und inaktiviert, was zu einer Verlängerung des Zelllebens führt. [80, 106]

### **3.6.2. Zellzyklusprogression und Proliferation**

AKT/PKB spielt eine wichtige Rolle in der Zellzyklusprogression, insbesondere für den Wechsel der G1-Phase zur S-Phase [106].

Das Retinoblastom Protein pRB kontrolliert und hemmt diesen G1-S-Phasenwechsel, indem es die Transkription zahlreicher für diese Progression erforderlichen Gene supprimiert [64, 106]. In T-Zellen konnte man erstmals zeigen, daß AKT/PKB an der Regulation des Retinoblastom-Proteins pRB und folglich an der Zellzyklusbeschleunigung beteiligt ist [106, 21]. Zahlreiche Studien kommen zu dem Schluß, daß AKT/PKB dies über die Kontrolle der Expression oder des Aktivitätszustandes von Cyclin D1, p27KIP1 und p21CIP1 erreicht, die wiederum mit dem Retinoblastom-Protein interagieren [106, 24].

#### **4. Fragestellung und Zielsetzung der vorliegenden Untersuchung**

Granulosazelltumoren sind sehr seltene, meist hormonell aktive Neoplasien des ovariellen Keimstrangstromas mit semimalignem Verhalten und daher nur sehr schwer abschätzbarer Prognose. Sie unterscheiden sich von den viel häufigeren epithelialen Tumoren nicht nur histomorphologisch, sondern auch molekulopathologisch.

Ergebnisse aus der Literatur und Voruntersuchungen im Pathologischen Institut der LMU München zeigten, daß neben zahlreichen anderen genetischen Veränderungen insbesondere die Trisomie 14 eine häufig nachweisbare Aberration darstellt. Bekanntermaßen sind auf dem Chromosom 14 zahlreiche für die Genese anderer Tumoren relevante Onkogene lokalisiert.

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, die Pathogenese der Granulosazelltumoren, unter Berücksichtigung der prognostischen Relevanz, weiter aufzuklären. Auch im Hinblick auf die Prognoseabschätzung und den daraus resultierenden Therapiemaßnahmen könnte ein besseres Verständnis der tumorbiologischen Prozesse hilfreich sein.

Speziell wurden in der vorliegenden Schrift folgende Fragestellungen bearbeitet:

Ist die in der CGH häufig nachgewiesene Trisomie 14 mit einer Amplifikation des AKT1, eines für die Tumorprogression wichtigen Onkogens assoziiert?

Falls ja, kann diese Amplifikation mit Hilfe der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung nachgewiesen werden?

Falls ja, korreliert die nachgewiesene Amplifikation mit dem wichtigsten Prognosefaktor, dem Tumorstadium und mit dem Überleben?



## II. MATERIAL und METHODEN

### 1. Material

Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung wurde an archivierten Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Operationsmaterial von 29 Granulosazelltumoren, darunter ein juveniler Typ (Fallnr. 22) durchgeführt. Das Tumormaterial stammte von Patientinnen, die alle zwischen 1970 und 2002 in der Abteilung für Gynäkologie des Klinikums Grosshadern der LMU-München chirurgisch behandelt wurden.

Eine zusätzliche präoperative Therapie hatte keine der Patientinnen erhalten.

Das Alter der Patientinnen zum Zeitpunkt der Operation lag zwischen 6 und 84 Jahren (Durchschnittsalter: 57,5 Jahre, Medianes Alter: 62 Jahre). Diagramm II.1. zeigt die Altersverteilung mit Normalverteilungskurve.

Alle Fälle wurden nach den International Federation of Gynaecologists and Obstetricians (FIGO)-Kriterien einem Tumorstaging unterzogen (siehe Diagramm II.2.).

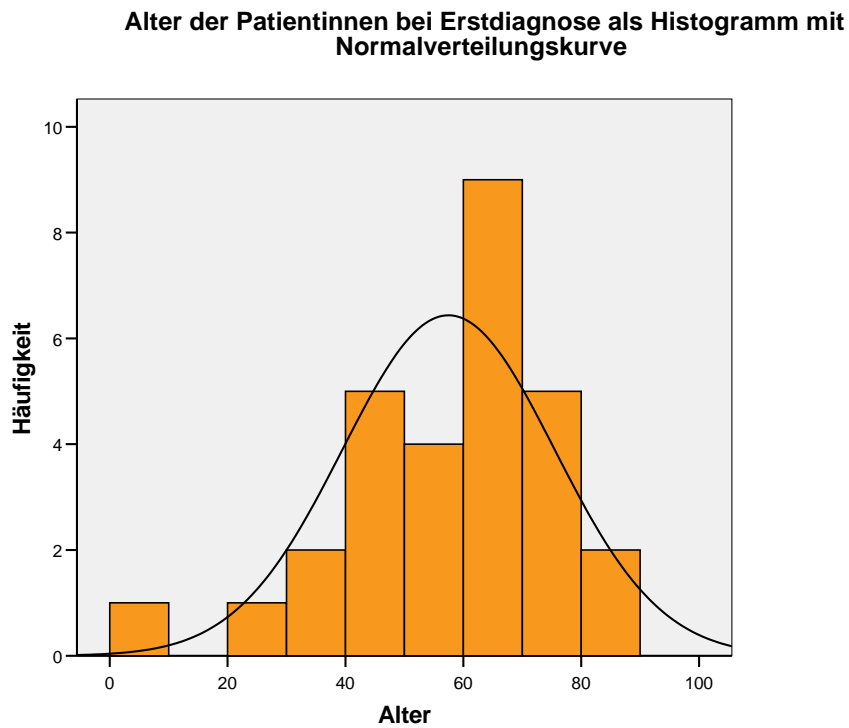
Da die herkömmlichen histologischen Parameter wie Mitoseindex, Grad der Kerndysplasie oder Wachstumsmuster bei Granulosazelltumoren keine Dignitätsbestimmung erlauben, erfolgte unter besonderer Berücksichtigung des klinischen Verlauf eine interne Dignitätsabschätzung der Tumorpräparate in 3 Malignitätsstufen (benigne, eher maligne, maligne mit Metastasierung). Neun (31%) der insgesamt 29 Granulosazelltumor wurden als benigne, neun (31%) als eher maligne und elf (37,9 %) als maligne eingestuft.

Zu 24 von 29 Fällen existieren klinische Follow-up Daten und Überlebensdaten. Der postoperative Beobachtungszeitraum lag zwischen einem und 400 Monaten mit einem Median von 161 Monaten. In diesem Zeitraum sind 7 Patientinnen verstorben, davon 6 tumorabhängig, eine der Patientin an einem tumorunabhängigem Ereignis (siehe Tab. II.1)

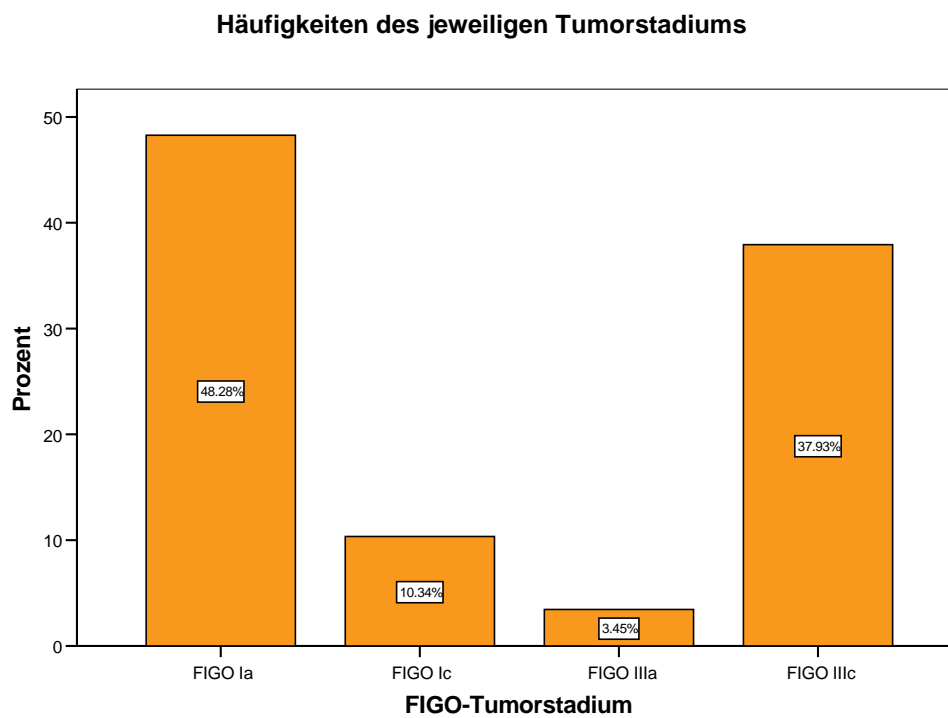
Im Vorfeld zu dieser Arbeit hatten Mayr et al. über die Komparative genomische Hybridisierung (CGH) an 20 Granulosazelltumoren bei 5 (25%) einen Zugewinn genetischen Materials am q-Arm des Chromosom 14 festgestellt [100].

Tabelle II.2. zeigt die Ergebnisse der Komparativen genomischen Hybridisierung des in der Zwischenzeit 29 Fälle umfassenden Kollektivs.

**Diagramm II.1.**



**Diagramm II.2.**



**Tabelle II.1.**

<b>Fall Nr.</b>	<b>Alter</b>	<b>Interne Dignitätsabschätzung</b>	<b>FIGO-Stadium</b>	<b>Rezidiv</b>	<b>Lebens-status</b>	<b>Beobachtete Überlebenszeit nach Erstdiagnose in Monaten</b>
1.	64	maligne	IIIc	ja	lebt	208
2.	77	benigne	Ia	nein	lebt	179
3.	61	benigne	Ia	nein	lebt	183
4.	67	eher maligne	Ia	nein	lebt	192
5.	63	eher maligne	Ia	nein	lebt	127
6.	51	eher maligne	Ia	nein	lebt	161
7.	50	eher maligne	Ia	nein	lebt	124
8.	48	benigne	Ia	nein	lebt	192
9.	45	eher maligne	Ic	ja	gestorben	87
10.	54	eher maligne	Ia	ja	lebt	103
11.	58	benigne	IIIc	nein	keine Angabe	keine Angabe
12.	62	eher maligne	Ic	nein	lebt	75
13.	70	maligne	IIIc	nein	gestorben	23
14.	21	eher maligne	Ia	nein	gestorben	72
15.	63	maligne	IIIa	ja	gestorben	142
16.	77	maligne	IIIc	ja	gestorben	102
17.	49	maligne	IIIc	ja	gestorben	288
18.	39	maligne	IIIc	ja	gestorben	49
19.	84	benigne	Ia	nein	keine Angabe	keine Angabe
20.	46	maligne	IIIc	nein	lebt	32
21.	65	maligne	IIIc	nein	lebt	400
22.	6	eher maligne	Ia	nein	lebt	55
23.	68	benigne	Ic	nein	lebt	46
24.	76	maligne	IIIc	ja	lebt	231
25.	76	maligne	IIIc	nein	gestorben	1
26.	42	benigne	Ia	nein	keine Angabe	keine Angabe
27.	84	maligne	IIIc	ja	lebt	244
28.	65	benigne	Ia	nein	keine Angabe	keine Angabe
29.	36	benigne	Ia	nein	keine Angabe	keine Angabe

**Tabelle II.2.**

<i>Fall-Nr.</i>	<i>Zugewinne und /oder Verluste im CGH-Karyogramm</i>
1	normales Karyogramm
2	X-
3	<b>14q+</b> , 22q-
4	9+, 21q+
5	3+, 12+, 20+, 9+
6	normales Karyogramm
7	normales Karyogramm
8	2p+, 3p+, 3q+, 10q+
9	<b>14q+</b> , 22q-
10	12q22-qter-, 17-, 19-, 22q-
11	1p+, X+
12	8+, 10+, 12+, <b>14q+</b> , 13q+
13	8+, 10p-, <b>14q+</b> , 21q-, 22q-, 13q12-p21-, 17-
14	normales Karyogramm
15	21q-
16	13q14-qter-, 13q12-q13+, 15q+, 16q-, 17p+, 18+, 22q-, 21q+, 7q11.2-q22, 7q31-qter
17	7+, 16q-
18	1p-, 1q+, 4-, 5q11.2-q23-, 9p-, 12p+, 18-, 22q-, 13q12-q14-, 13q22-qter-
19	9q+, 13q+, 15q+, 16p+, 19q+, 21q+
20	normales Karyogramm
21	12p+, 16q-, <b>14q+</b> , 22q-
22	normales Karyogramm
23	9q-
24	9q-, 21-, 22-
25	9q-, 21q-, 15p-, 22-
26	9q-
27	<b>14q+</b>
28	1q-, <b>14q+</b> , 15q+, 16p+, 19q+, 20p+, 20q+
29	21q+

Tab II.2. Ergebnisse der Komparativen genomischen Hybridisierung, teilweise von Mayr et al. veröffentlicht [100]

## **2. Prinzip und Methodik der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung**

Durch die Technik der *in situ*-Hybridisierung gelang es erstmals Gall und Pardue, zeitgleich auch John et al. mit radioaktiv markierten Nukleotiden komplementäre DNA-Sequenzen darzustellen [55, 78].

Das Prinzip der *in situ*-Hybridisierung ist die spezifische Bindung von markierten DNA-Einzelstrangfragmenten (Sonden) an komplementären DNA-Zielsequenzen in den zu untersuchenden (Tumor-) Zellen. Diese Sonden-Ziel-DNA-Hybride werden je nach Markierung sichtbar gemacht und Gen und Chromosomenabnormalitäten können entdeckt werden.

Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung, die letztlich durch die Entwicklung nicht-radioaktiver Markierungstechniken ermöglicht wurde [90], benutzt zur Sondenmarkierung Fluoreszenzfarbstoffe, die durch den Einsatz spezieller Filter unter dem Fluoreszenz-Mikroskop darstellbar sind.

Die Methodik umfaßt eine Vorbehandlung der Schnittpräparate mit zellmembranverdauenden Reagentien, um eine Penetration der Sonden-DNA in die Zellkerne zu gewährleisten (siehe Kapitel 4. Vorbereitung der Präparate zur Hybridisierung).

Bei der anschließenden Denaturierung von Proben und Ziel-DNA werden die DNA-Doppelstränge auseinandergelöst, so daß sich bei der Inkubation bei 37°C Hybrid-Doppelstränge zwischen markierter Proben-DNA und komplementärer Ziel-Nukleotidsequenz bilden.

In dieser Arbeit wurde die Methode des dualen Denaturierens verwendet, d. h. Sonden- und Ziel-DNA wurden gemeinsam auf dem Objektträger vorliegend erhitzt (siehe Kapitel 5. *In situ*-Hybridisierung).

### **3. Herstellung der Proben-DNA (Sonden-DNA)**

#### **3.1. Prinzip der Sondenherstellung**

Ein spezifisches Bakterienklon, welches die lokusspezifische DNA-Sequenz der Ziel-DNA (in unserem Fall das AKT-1 Gen) in seinem Genom enthält, wird vermehrt und nach alkalischer Zelllyse wird seine DNA über einen Anionenaustausch isoliert.

Die Nick-Translation markiert die DNA- Sonde und macht sie somit detektabel.

#### **3.2. Auswahl des Bakterienklons**

Für den passenden locusspezifischen Bakterienklon wurde die spezifische Nucleotidsequenz des humanen AKT-1 Gens über die Webseiten [www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human) ermittelt und diese in das BLAST-Programm [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) eingegeben.

Das Klon mit internationaler Klonnummer RP 11-982M15, welches neben dem AKT-1 Gen auch SIVA, ADSSL, Hs 163667, C14 orf 151, C14orf173 enthält wurde als Chloramphenicolresistentes Bacterial Artificial Chromosome (BAC) bei RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH, 14059 Berlin, Deutschland) bezogen.

#### **3.3. Vermehrung und Isolierung der BAC-DNA**

##### **3.3.1. Anlegen der E.coli Kultur**

LB-Agar wurde nach Zugabe von Chloramphenicol in einer Endkonzentration von 12,5 µg/ml mit den angelieferten Klonen ausgestrichen (3-Ösenstrich) und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die entstandenen Einzelkolonien wurden in 5 ml LB-Broth inklusive Chloramphenicol von 12,5 µg/ml Endkonzentration überimpft und 8 h bei 37°C im Schüttler bei 250 rpm inkubiert. Danach erfolgte eine Überimpfung von 1 ml der Kultur in 100 ml LB-Broth inklusive 12,5 µg/ml Chloramphenicol, die wiederum 16 h bei 37°C inkubierte.

##### **3.3.2. Isolierung der BAC-DNA aus E.coli mittels NucleoBond BAC 100 Kit**

###### **3.3.2.1. Isolation der BAC-DNA mittels alkalischer Zelllyse**

Nach 15-minütiger Zentrifugation der Bakterienkultur mit 6000g bei 4°C wurde das nach Dekantieren gewonnene Pellet zur Entfernung zellulärer RNA in 24 ml Puffer S1 inklusive RNase A homogen suspendiert. Zur Lysierung wurden 24 ml Puffer S2 und

nach 6-8maligen vorsichtigen Invertieren weitere 24 ml Puffer S3 hinzugefügt. Nach vorsichtigen Invertieren wurde die jetzt homogen weiß geflockte Suspension 5 Minuten zur Inkubation auf Eis gelegt.

#### **3.3.2.2. Aufreinigen der BAC-DNA über Anionenaustausch**

Zuerst erfolgte die Equilibration einer NucleoBond BAC 100 Kit Säule mit 6ml Puffer N2. Das bakterielle Lysat wurde über ein mit Puffer N2 befeuchteten Filter geklärt.

Der aufgefangene Durchfluss wurde über die Säule laufen gelassen, danach wurde die Säule zweimal mit je 18 ml Puffer N3 gewaschen.

Zur Elution der DNA wurde 15 ml auf 50°C vorgewärmter Puffer N5 hinzugegeben.

Dann erfolgte mit 11ml Isopropanol eine Präzipitation der eluierten DNA und bei 15000g 30 Minuten bei 4°C eine Zentrifugation.

Nach Waschen des Pellet mit 5 ml 70%igem Ethanol wurde diese Lösung wiederum bei 15000g bei RT (Raumtemperatur) zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der Pipette dekantiert und das Pellet luftgetrocknet. Zum Lösen wurde das luftgetrocknete Pellet in 200 µl sterilem deionisiertem Wasser aufgenommen und 20 Minuten im Schüttler gelassen.

### **3.4. Überprüfen der BAC-DNA**

Die Konzentration der gewonnenen DNA wurde mittels Absorptionsspektrometrie am Photometer bestimmt und in der Agarosegelelektrophorese auf etwaige Verunreinigungen mit bakterieller Chromosomen-DNA untersucht.

#### **3.4.1. DNA-Konzentrationsbestimmung am Photometer**

##### **Prinzip:**

Bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum der DNA kann die Nukleinsäurekonzentration mittels Absorptionsspektrometrie bestimmt werden.

Die gelöste DNA wird 1:20 verdünnt und in einer Quarzküvette von 1 cm Schichtdicke gegen ihr Lösungsmittel als Referenz gemessen. Die Grundabsorption wird bei 310 nm gemessen. Die Arbeitsschritte sind in Protokoll II.1 dargestellt.

Die anschließende Berechnung der DNA- Konzentration geschah nach folgender Formel:

$$\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = 0,05 \times \text{VF} \times (\text{A}_{260 \text{ nm}} - \text{A}_{310 \text{ nm}})$$

A<sub>260nm</sub> : Absorptionsmaximum der DNA

A<sub>310nm</sub> : Grundabsorption der Probe

0,05 : Extinktionskoeffizient der DNA bei 260nm

VF : Verdünnungsfaktor

### **Protokoll II.1.: DNA-Konzentrationsbestimmung am Photometer**

Arbeitsschritt	
1.	Verdünnung von 5 µl DNA mit 95 µl Aqua bidest. -----Verdünnungsfaktor VF= 20
2.	Messung am Photometer in einer Quarzküvette bei 260 nm und bei 310 nm
3.	Messung des Leerwerts mit 100µl Aqua bidest. in einer Quarzküvette

### **3.4.2. Agarosegelelektrophorese der DNA**

#### **Prinzip:**

Die Agarosegelelektrophorese ist ein Standardverfahren zur Auftrennung von Nukleinsäuremolekülen. Die zu untersuchende DNA wird neben einem Molekulargewichtsstandardmarker bekannter Basenpaarlänge in einem Agarosegel aufgetragen. Nach dem Anlegen einer Spannung wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren vom negativen zum positiven Spannungspol. Die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld hängt dabei unter anderem von der Molekülgröße und somit von der Basenpaarlänge ab.

Nach dem Elektrophoreselauf wird das Agarosegel in einer Ethidiumbromidlösung gefärbt. Ethidiumbromid interkaliert mit den aufgetrennten DNA-Fragmenten, so daß diese im UV-Licht sichtbar gemacht werden können.

Mit einer MP4-Kamera (Polaroid, GmbH, Offenbach) wird das Trennungsergebnis dokumentiert. Eine Kontamination der Proben-DNA mit bakterieller DNA würde sich in zusätzlichen Banden (Smears) zeigen.

Protokoll II.2 zeigt die erforderlichen Arbeitsschritte. Unter Vorarbeiten ist die Herstellung der erforderlichen Reagentien beschrieben.



## Vorarbeiten:

### Herstellung von EDTA 0,5M pH 8,0

EDTA                      29,23 g  
NaOH-Pellets            4,00 g  
Aqua bidest.            ad 200 ml

### Herstellung von 10xTBE-Puffer

TRIS-Base              108,00 g  
Borsäure                55,00 g  
Na<sub>2</sub> EDTA 2H<sub>2</sub>O        8,30 g  
Aqua bidest.            ad 1000 ml

### Herstellung von 1x TAE-Puffer

TRIS-Base              48,40 g  
Essigsäure              11,42 g  
EDTA 0,5M pH 8,0    40,00 ml  
Aqua bidest.            ad 1000 ml

### Herstellung von Ethidiumbromidlösung

Ethidiumbromid        300 µl  
Aqua bidest.            300 µl

## Protokoll II.2.: Agarosegelelektrophorese

Arbeitsschritte	
1.	0,5% iges Agarosegel herstellen:  Agarose              0,5 mg 10xTBE-Puffer    10 ml Aqua bidest.        90 ml  durch Aufkochen in Lösung bringen
2.	Gellösung in gewünschte Kammform mit senkrechten Geltaschenformer eingiessen
3.	Das erstarrte Agarosegel in passende Gelkammer mit 1x TAE-Puffer in den Elektrophoreseapparat einsetzen
4.	Proben-DNA und StandardMarker 1:6 mit 1xTAE-Puffer verdünnt in die Geltaschen pipettieren
5.	Anlegen der Spannung ( 100 V)
6.	Anschliessend Färben des Agarosegels in der Ethidiumbromidlösung
7.	Dokumentation unter der UV-Lampe und mit Polaroidkamera

### 3.5. Sequenzieren der DNA

Um sicher zu stellen, daß die Sonden-DNA die uns interessierende Nucleotidsequenz des AKT-1 Gens enthält, wurde die Sonde mittels Big Dye V.1.1.Sequencing RR 100 (Applied Biosystems) und dem EinKapillar-Sequenziergerät ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin and Elmer) sequenziert. Die ermittelte Nukleotidsequenz wurde in das BLAST-Programm ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).) eingegeben, um eine Übereinstimmung mit dem AKT-1Gen und unserem BAC-Klon festzustellen.

#### Prinzip:

Das Prinzip der Cycle-Sequencing-Reaktion beruht auf der Sequenzierung durch Kettenabbruch [123] bei gleichzeitiger Anwendung der PCR.

Ausgangsmaterial für die Reaktion ist einzelsträngige DNA, die durch Denaturierung erhalten wird. Diese Matrizen-DNA wird mit einem Oligonukleotid, dem Sequenzierungsprimer hybridisiert. Durch Einsatz einer DNA-Polymerase und Nukleotidtriphosphate erfolgt die enzymatische Synthese des zur Matritze komplementären Strangs.

Ein gewisser Prozentsatz der eingesetzten Nukleotide sind fluorchrommarkierte Dideoxynukleotide (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP), wobei jedes Dideoxynukleotid mit einem eigenem Fluorchrom markiert ist.

Beim Einbau eines Dideoxynukleotids in den Strang kommt es zum Kettenabbruch. Diese Reaktion (Denaturierung, Anhybridisierung des Primers und Aufpolymerisierung zum Doppelstrang mit Kettenabbruch beim Einbau eines Dideoxynukleotid) kann durch Einsatz einer thermostabilen DNA-Polymerase automatisiert in einem Reaktionsansatz im Thermocycler erfolgen.

Bereits nach 20 Reaktionszyklen erhält man eine zigfache Anreicherung der eingesetzten DNA, die durch Kettenabbrüche in zahlreichen Fragmenten unterschiedlicher Länge vorliegt.

Diese Fluorchrom-markierten DNA-Fragmente werden vom Laserstrahl des Detektors (ABI PRISM 310, Perkin and Elmer) getroffen. Das Fluoresceinmolekül am Kettenende wird angeregt, das emittierte Licht von Photorezeptoren detektiert, die Daten verrechnet und entsprechend computerlesbar dokumentiert.

Da jedes Fluorchrom einer Base bzw einem Dideoxynukleotid, welches zu einem Strangabbruch führt zugeordnet ist kann die Sequenz bestimmt werden.

Protokoll II.3. beschreibt die jeweiligen Arbeitsschritte.

### Protokoll II.3.: Sequenzieren der DNA-Sonde

1.	TRM-Mix                      2µl Primer (12,5 pMol)        1,25 µl Template                     1 µl Aqua bidest                 ad 10 µl	Reagentien jeweils in ein Thermocycler-Tube einfüllen und in den Thermocycler einsetzen
2.	25 Zyklen jeweils 96°C 10 sec 50°C 5 sec 60°C 4 min	Cycle-Programm eingeben
3.	Thermocycle-Produkt im ABI-PRISM 310 Genetic Analyzer sequenzieren	
4.	Vergleich der ermittelten Sequenz im BLAST-Programm	

### 3.6. Markieren der Sonden-DNA mittels Nick-Translation

#### Prinzip:

Bei der Nick-Translation werden durch die 5'-3'-exonukleolytische Aktivität der E.coli DNA-Polymerase I Einzelstrangbrüche (sogenannte „Nicks“) in die DNA gesetzt. An den so entstandenen Fragmentenden werden unter Vermittlung der Polymeraseaktivität des Enzyms die eingesetzten Nukleotide (dNTPs und Hapten-markierte dUTPs, in diesem Fall Digoxigenin-dUTPs) am 3'-OH- Ende angelagert und eine neue doppelsträngige DNA hergestellt. Das an dUTP gekoppelte Hapten Digoxigenin wird an Stelle des Nukleotids dTTP in die Sonden-DNA eingebaut und somit markiert. Das Digoxigenin dient als sensitives Ziel für die indirekte immunologische Detektion über ein fluoreszierendes Anti-Digoxigenin Fab Fragment.

In Protokoll II.4. werden die erforderlichen Arbeitsschritte der Nick-Translation dargestellt, sowie in Protokoll II.5. die Arbeitsschritte der anschliessenden DNA-Fragmentlängenbestimmung auf einem 2%igem Agarosegel neben einem DNA Molekulargewichtsmarker.

#### **Protokoll II.4.: Nick-Translation**

Arbeitsschritte	
1.	1 µg Template-DNA in 16 µl Aqua bidest hinzufügen
2.	Hinzufügen von 4 µl DIG-Nick Translation Mix mischen und kurz zentrifugieren
3.	90 Minuten bei 15°C inkubieren
4.	Stop der Reaktion durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) und Aufheizen des Reaktionsgemisches auf 65°C für 10 Minuten

#### **Protokoll II.5.: Bestimmung der Fragmentlänge der markierten DNA**

Arbeitsschritte	
1.	Reaktionsgemisch auf Eis legen
2.	3 µl des Reaktionsgemisches werden mit TAE- Puffer 3 Minuten bei 95°C denaturiert
3.	3 Minuten Inkubation auf Eis
4.	Laufenlassen der Probe auf einem 2%igem Agarosegel, neben einem DNA-Molekulargewichtsmarker ( siehe Protokoll II.2.: Agarosegelelektrophorese)

#### **4. Vorbereitung der Präparate zur Hybridisierung**

Alle Paraffin-eingebetteten Präparatblöcke wurden bei Raumtemperatur (RT) 4 µm dick geschnitten und auf SuperFrost/Plus Objektträger (Menzel, Germany) aufgezogen und 20 Minuten auf der 80°C heißen Heizplatte getrocknet.

Küvetten wurden mit den Objektträgern bestückt und dann in die mit den verschiedenen Reagentien gefüllten Behältern gemäß dem Protokoll II.6. gesetzt.

Protokoll II.6 schildert die jeweiligen Vorbehandlungen mit diversen Reagentien, welche die auf den Objektträgern aufgezogenen Präparate zur Vorbereitung auf die Hybridisierung erfahren mussten.

Unter Vorarbeiten ist die Herstellung der hierfür erforderlichen Reagentien geschildert.

### *Vorarbeiten:*

#### **Herstellung von**

*0,01% ige Pepsinlösung in 0,2 N (Normal) HCl*

#### **Herstellung von Paraformaldehyd 4%**

*20 g Paraformaldehyd in 250 ml Aqua bidest*

*in der Mikrowelle erwärmen, NaOH Pellets*

*zum Klären hinzugeben*

*50 ml 10x TRIS pH 7,4 hinzugeben*

*pH-Wert einstellen*

*auf 500ml mit Aqua bidest auffüllen*

### **Protokoll II.6.: Vorbehandlung der Objektträger**

<b>Reagenz</b>	<b>Inkubation</b>	<b>Bemerkung</b>
Xylol	25 Minuten bei RT	Paraffinentfernung
EtOH abs	2 Minuten bei RT	Entfernung von Xylolresten
EtOH 96%	2 Minuten bei RT	Entfernung von Xylol und Rehydrierung
EtOH 70%	2 Minuten bei RT	siehe vorherige Zeile
Aqua bidest	5 Minuten bei RT	Rehydrierung
TRS 6	20 Minuten im kochenden Wasserbad	Andau von Zell- und Zellkernmembranen, partielle Auflösung dieser um eine Sondendurchlässigkeit zu erreichen
TRS 6	20 Minuten bei RT auskühlen lassen	siehe vorherige Zeile
Aqua bidest	5 Minuten bei RT	Stopp des TRS 6 Verdaus
0,01% Pepsin in 0,2 N HCl	15 Minuten bei RT	Proteolytischer Zell- und Zellkernmembranverdau für die Sondendurchgängigkeit!
Aqua bidest.	5 Minuten bei RT	Stopp des Pepsinverdaus
Paraformaldehyd 4%	10 Minuten bei RT	Refixieren der neugeschaffenen Strukturen
Aqua bidest.	5 Minuten bei RT	Entfernung des Paraformaldehyds
Anschließend Lufttrocknen der Objektträger		

## **5. *In situ*-Hybridisierung**

### **5.1. Vorbereitung der Sonden-DNA-Mischung und Auftragen der Probe**

Die DIG-markierte Sonden-DNA wurde in 10%iger Konzentration in DAKO Hybridisierungsmix gelöst. Diese Proben-DNA Lösung wurde auf die gemäss Protokoll II.6. vorbereiteten Objektträger aufgetragen und sofort mit einem Deckglas verschlossen.

### **5.2. Duale Denaturierung der Ziel-DNA und DIG-markierter Proben-DNA und Hybridisierung**

Zur DNA-Denaturierung erfolgte anschliessend eine 3-minütige Lagerung der behandelten Objektträger auf der 95°C heißen Heizplatte. Nachdem die Deckgläser mit Hilfe von Fixogum (Marabu, Tamm) luftdicht verschlossen wurden, erfolgte über Nacht die Inkubation in einem feuchten Hybridisierkasten bei 37°C.

### **5.3. Stringentes Waschen und Nachweis der Hybridisierung**

Um überschüssige Sonden-DNA, die keine oder falsche Bindungen eingegangen waren von den Objektträgern abzuwaschen, erfolgten nach Entfernen von Fixogum und des Deckgläschens mehrere Waschschrte in stringenten Lösungen sowie eine Behandlung mit Blocking –Lösung um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. In Protokoll II.7. sind die Arbeitsschritte dargestellt. Alle Waschschrte wurden im Dunkeln im Wasserbad der jeweils angegebenen Temperatur durchgeführt.

Alle Inkubationsschritte erfolgten in einer dunklen feuchten Kammer bei 37°C, wobei die Objektträger mit Parafilm bedeckt wurden, um ein Austrocknen zu verhindern.

Anschliessend wurden die Objektträger mit DAPI-Vectashield eingedeckt, um über die DAPI-Kernfärbung die Auswertung zu erleichtern, sowie mittels Vectashield Mounting Medium das Verblässen der Präparate zu verzögern.

Die fertigen Objektträger wurden bis zur Auswertung bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Unter Vorarbeiten ist die Herstellung der erforderlichen Reagentien beschrieben.

**Vorarbeiten:**

**Herstellung von 20xSSC**

NaCl 350,6 g  
Na 3 Citratdihydrat 176,4 g  
Aqua bidest. 1,9 l  
ph auf 7, 0 einstellen, mit  
Aqua bidest auf 2 l auffüllen

**Herstellung von 0,05 M TRIS**

NaCl 43,9 g  
TRIS-HCl 34,25 g  
TRIS-Base 4,5 g  
mit Aqua bidest. auffüllen auf 5 l.

**Vorarbeiten bzw. folgende Verdünnungen herstellen:**

Herstellung von 0,1xSSC/0,1% Tween 20

Herstellung von TRIS/0,1% Tween 20

Herstellung von 0,5% NEN Blocking in TRIS Puffer

Verdünnung (1:625) von Anti-Digoxigenin Rhodamin in Dako-  
Verdünnungsmedium

Herstellung von DAPI-Vectashield Mischung (1:1000)

**Protokoll II.7.: Stringentes Waschen und Blocking**

Reagenz	Waschschritt / Inkubation	Bemerkung
0.1xSSC/0,1% Tween 20	3 x 10 Minuten Waschen der Objektträger (OT) bei 37°C	Abwaschen nicht gebundener Sonden-DNA
TRIS/0,1% Tween 20	5 Minuten Waschen der OT bei RT (Raumtemperatur)	Siehe vorherige Zeile
0,5% NEN-Blocking in TRIS	30 Minuten Waschen der OT bei RT	Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen für Anti-DIG Rhodamin
Anti-Digoxigenin Rhodamin in Dako-Verdünnungsmedium (1:625)	auf OT aufgetragen und mit Parafilm bedeckt 1 Stunde bei 37°C im Inkubationkästchen	Immunologische AK-AG-Bindung von Anti-Digoxigenin Rhodamin mit den DIG-markierten Sonden Nachweis der Hybridisierung
TRIS/0,1% Tween 20	5 Minuten Waschen der OT bei RT	Abwaschen nicht gebundenes Anti-DIG Rhodamin
Anti-Digoxigenin Rhodamin in Dako-Verdünnungsmedium (1:625)	auf OT aufgetragen und mit Parafilm bedeckt 1 Stunde bei 37°C im Inkubationkästchen	siehe oben
TRIS/0,1% Tween 20	5 Minuten Waschen der OT bei RT	siehe oben
Anti-Digoxigenin Rhodamin in Dako-Verdünnungsmedium (1:625)	auf OT aufgetragen und mit Parafilm bedeckt 1 Stunde bei 37°C im Inkubationkästchen	siehe oben
TRIS/0,1% Tween 20	5 Minuten Waschen der OT bei RT	siehe oben

## 6. Auswertung

Die Auswertung erfolgte an einem, mit einer HBO-100 Watt Quecksilberlampe sowie mit dualen und dreifachen Anregungsfiltern ausgestatteten Zeiss (Oberkochen, Germany) Axioskop-Fluoreszenz Mikroskop.

Tumorzellen wurden durch Vergleich mit dem entsprechenden HE-Schnitt des Präparats unter dem Lichtmikroskop identifiziert. Zellkerne wurden über den die DAPI-Kernfärbung anregenden Filter erkannt.

Pro Fall wurden Hybridisierungssignale in 100 Zellkernen gezählt, wobei nur Signale in Zellen mit klarer Zellkerngrenzlinie ausgewertet wurden.

Ein drittes Gensignal in einer Tumorzelle wurde einer zusätzlichen Genkopie in einem Interphasezellkern gleichgesetzt, da das disome Auftreten von single-copy-Genen in Interphase-Schnittpräparatzellen normal wäre [69].

Analog zu den Auswertungskriterien der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung von Abel et al. und Pauletti et al., wurden die Tumoren eingeteilt in solche, die in mehr als 10% der ausgezählten Zellkerne drei Gensignale hatten, und in solche Tumoren die in weniger als 10% oder in keinen der ausgewerteten Zellen drei Gensignale zeigten [1, 110].

## 7. Statistische Verfahren

Für die deskriptive statistische Auswertung der Daten wurde das Computerprogramm SPSS Version 12 (Superior Performance Software Systems (SPSS) for Windows, Microsoft, USA) eingesetzt.

Um die Signifikanz von Unterschieden zwischen den Fallgruppen zu prüfen, wurde bei größeren Fallzahlen der Chi-Quadrat-Test nach Pearson, bei kleineren Fallzahlen der exakte Test nach Fisher, bei mehr als 2 Gruppenvariablen der Kruskal-Wallis Test durchgeführt.

Häufigkeitsverteilungen bezüglich eines Merkmals in unterschiedlichen Fallgruppen wurden mit Hilfe des U-Test nach Wilcoxon miteinander verglichen, Mittelwertvergleiche mit dem T-Test.

Unterschiede zwischen den Fallgruppen wurden als statistisch signifikant gewertet, wenn die Wahrscheinlichkeit  $p$  für den Fehler erster Art kleiner als 0,05 war. Das Signifikanzniveau für hochsignifikante Unterschiede wurde mit  $p < 0,01$  festgelegt.



p von 0,05 – 0,08 wurde als sogenanntes borderline p-Wert festgesetzt, welches für eine vermutliche Signifikanz bei größerer Fallzahl sprechen würde.

Kaplan-Meier-Überlebensanalysen wurden durchgeführt, Unterschiede bezüglich dem Überleben verschiedener Fallgruppen wurden mit dem log-rank-Test ermittelt.

### **III. ERGEBNISSE**

#### **1. Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)**

Alle 29 Präparate konnten in der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung ausgewertet werden (beispielhaft in Abbildungen III. 1 - III.6. zu sehen).

Eine Gesamtübersicht aller Fälle mit Gensignalen pro Zellkern in 100 Zellkernen pro Präparat und der CGH-Ergebnisse hinsichtlich eines Zugewinns an 14q gibt Tabelle III.1.

**Tabelle III.1.**

Fall-Nr.	Zugewinn 14q in der CGH	1 Signal pro Zellkern	2 Signale pro Zellkern	3 Signale pro Zellkern	Ausgezählte Zellkerne
1	<i>nein</i>	9	91	0	100
2	<i>nein</i>	14	62	24	100
3	ja	6	34	60	100
4	<i>nein</i>	20	80	0	100
5	<i>nein</i>	9	91	0	100
6	<i>nein</i>	0	9	91	100
7	<i>nein</i>	11	89	0	100
8	<i>nein</i>	11	86	3	100
9	ja	3	47	50	100
10	<i>nein</i>	14	86	0	100
11	<i>nein</i>	15	85	0	100
12	ja	9	80	11	100
13	ja	0	42	58	100
14	<i>nein</i>	8	92	0	100
15	<i>nein</i>	3	97	0	100
16	<i>nein</i>	12	82	6	100
17	<i>nein</i>	0	100	0	100
18	<i>nein</i>	7	93	0	100
19	<i>nein</i>	2	98	0	100
20	<i>nein</i>	11	22	67	100
21	ja	0	2	98	100
22	<i>nein</i>	9	91	0	100
23	<i>nein</i>	6	94	0	100
24	<i>nein</i>	0	100	0	100
25	<i>nein</i>	0	100	0	100
26	<i>nein</i>	13	87	0	100
27	ja	0	60	40	100
28	ja	4	84	12	100
29	<i>nein</i>	13	87	0	100

**Abbildung III.1.**

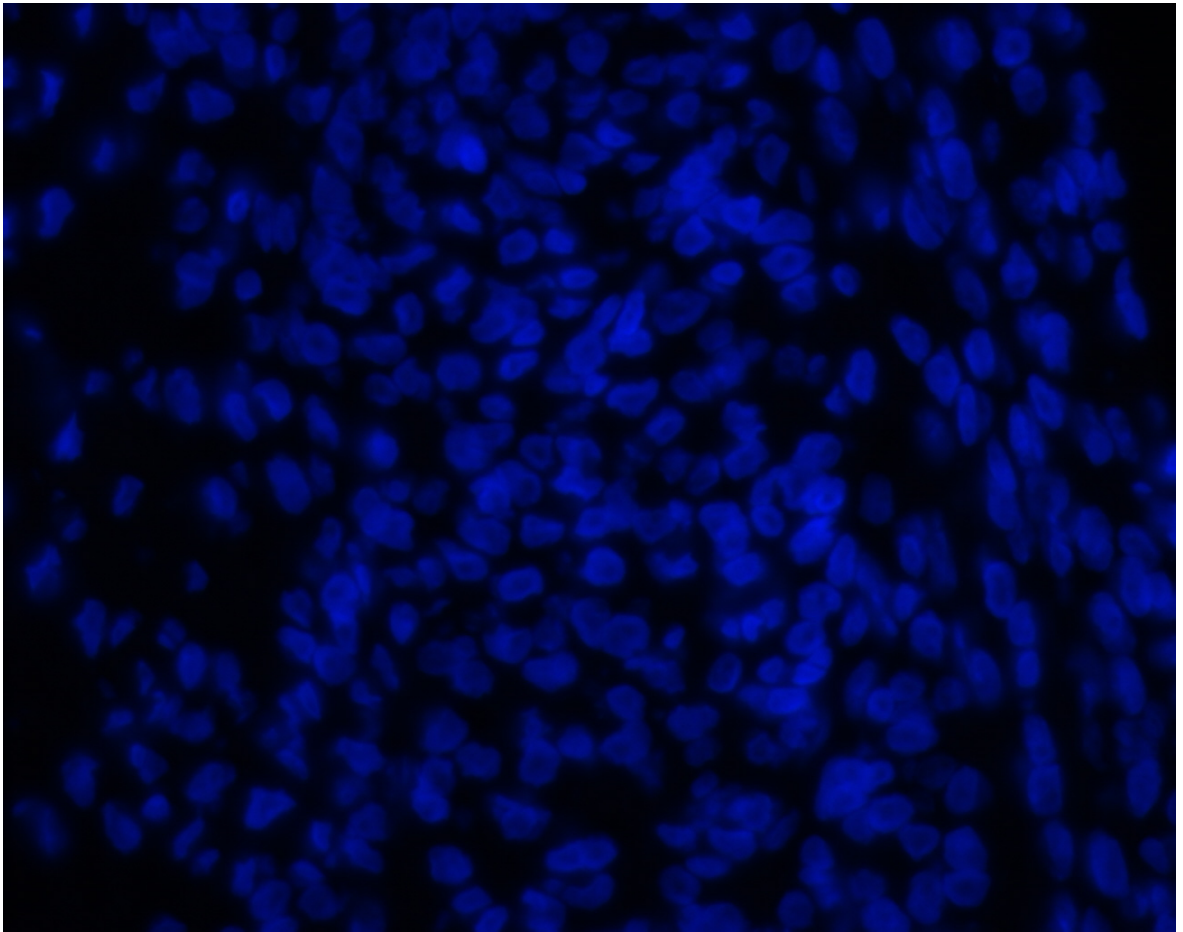


Abb.III.1. FISH-Präparat eines Granulosazelltumors: Fluoreszenzmikroskopie unter DAPI-Kernfärbung anregenden Filter.

### Abbildung III.2.

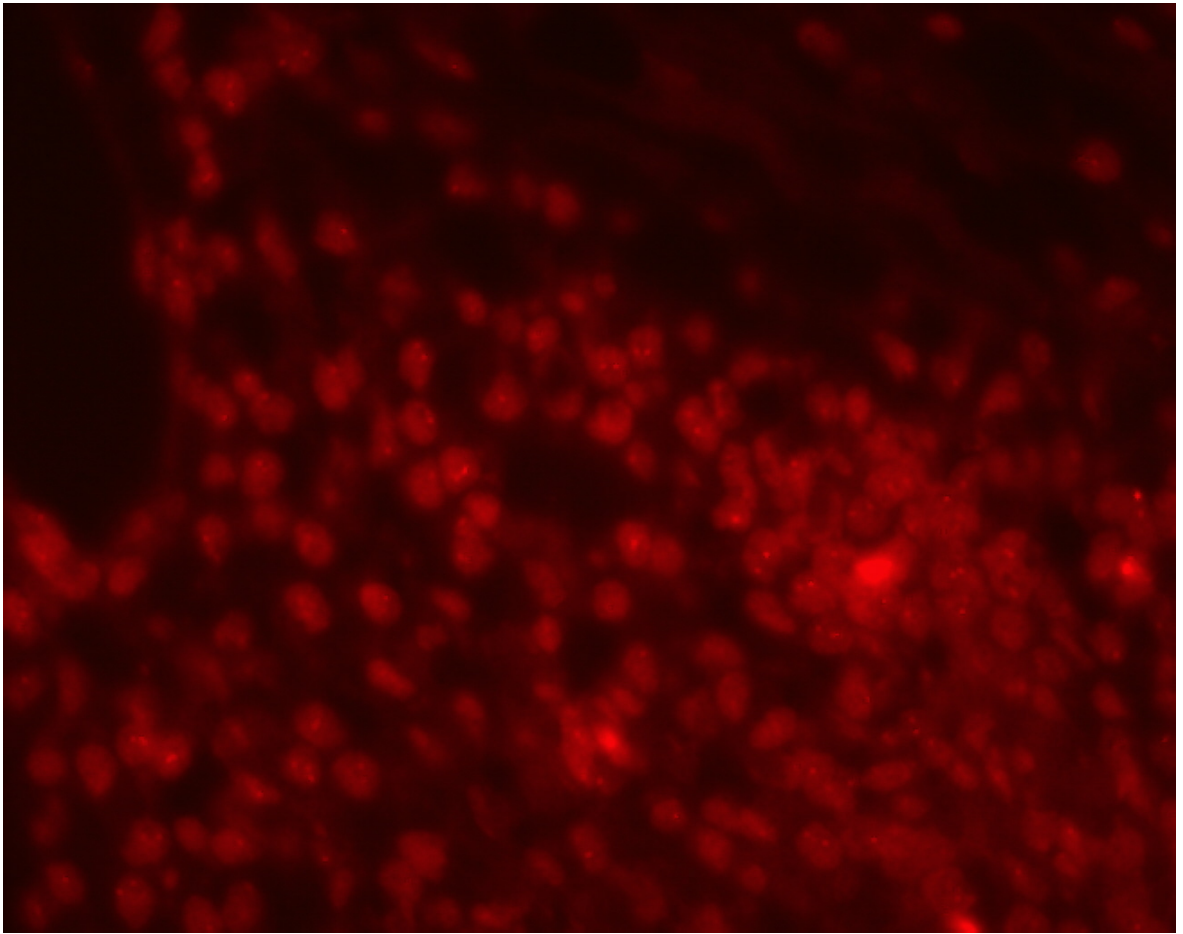


Abb.III.2. selbes Präparat wie in Abb.III.1. unter Sondenfluoreszenzfarbstoff anregenden Filter.

**Abbildung III.3.**

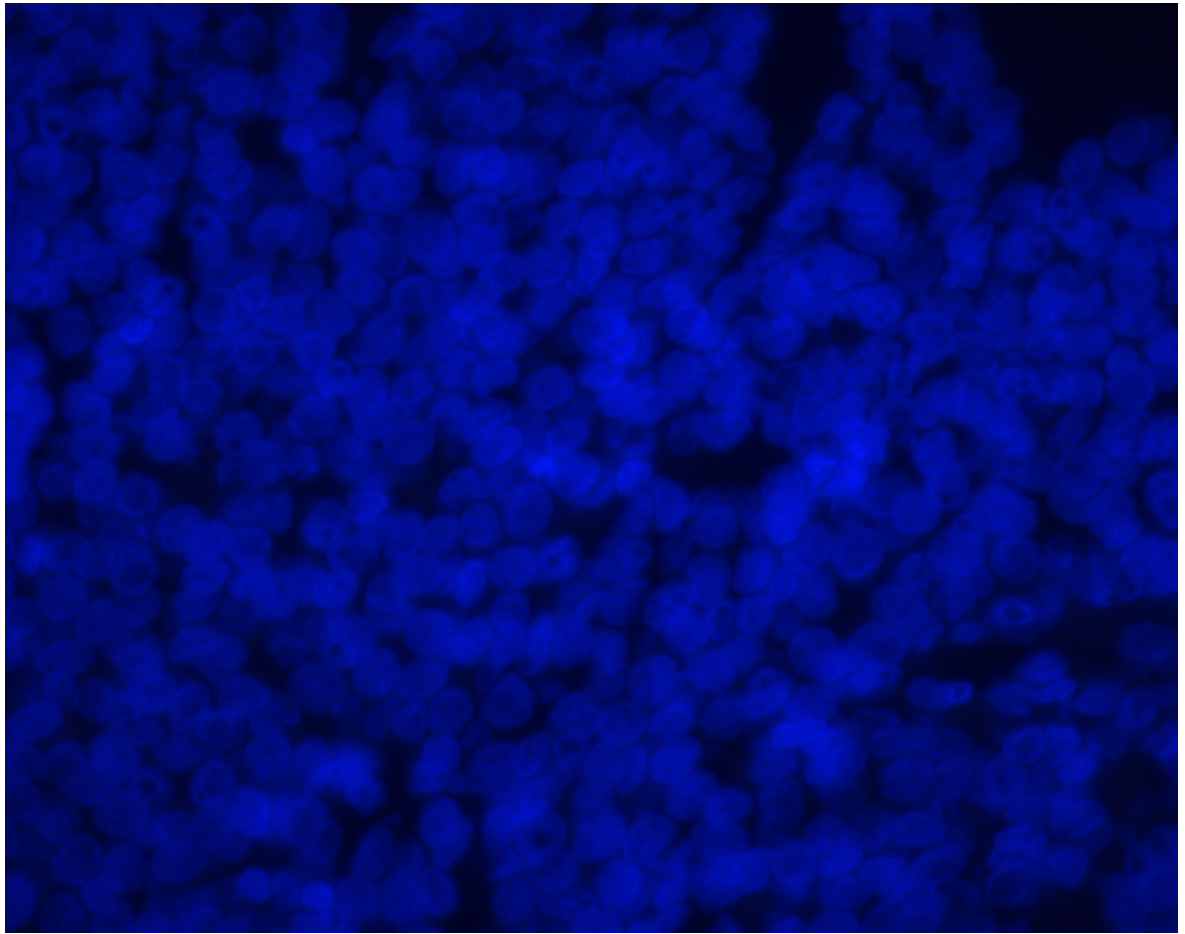


Abb.III.3. FisH- Präparat eines Granulosazelltumors: Fluoreszenzmikroskopie unter DAPI- Kernfärbung anregenden Filter.

**Abbildung III.4.**

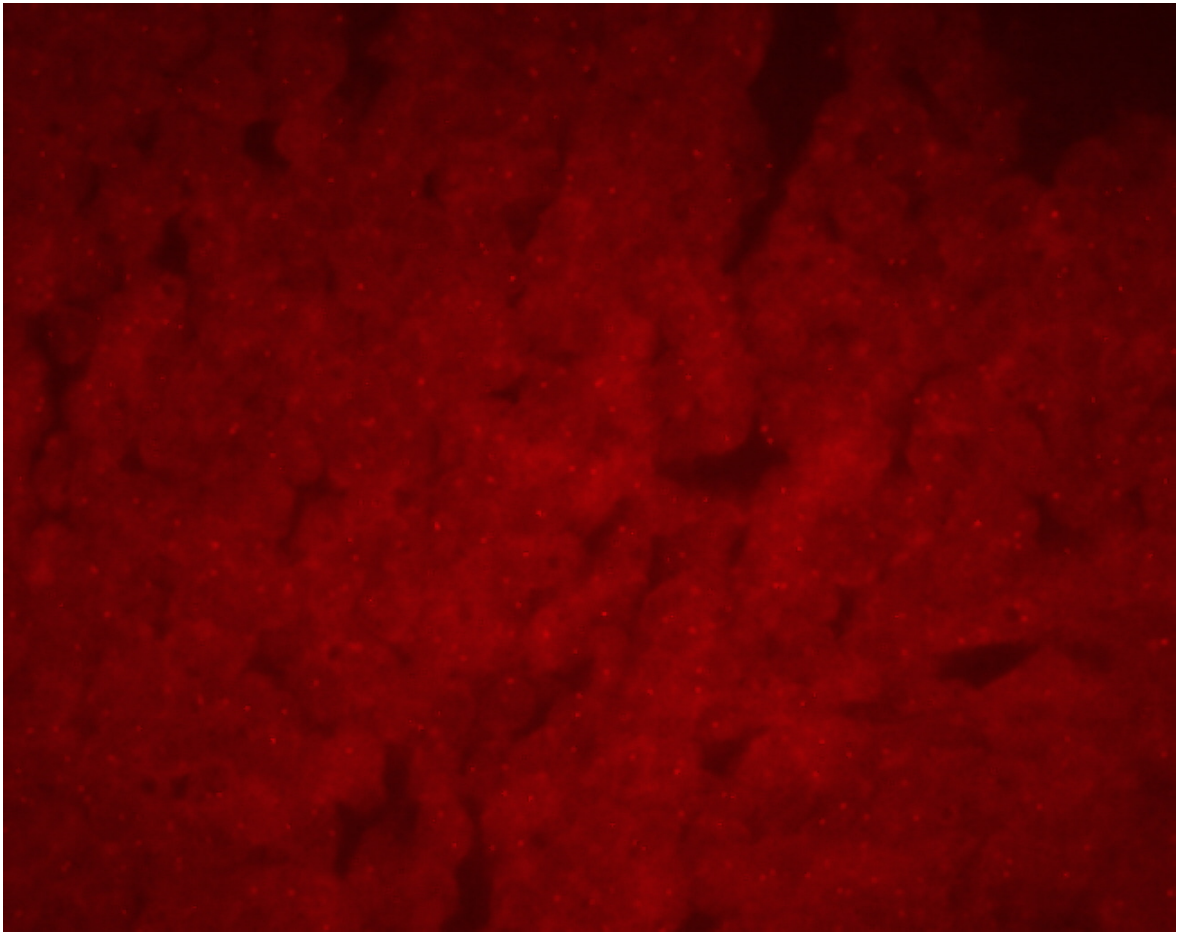


Abb.III.4. selbes Präparat wie in Abb.III.3. unter Sondenfluoreszenzfarbstoff anregenden Filter.



**Abbildung III.5.**

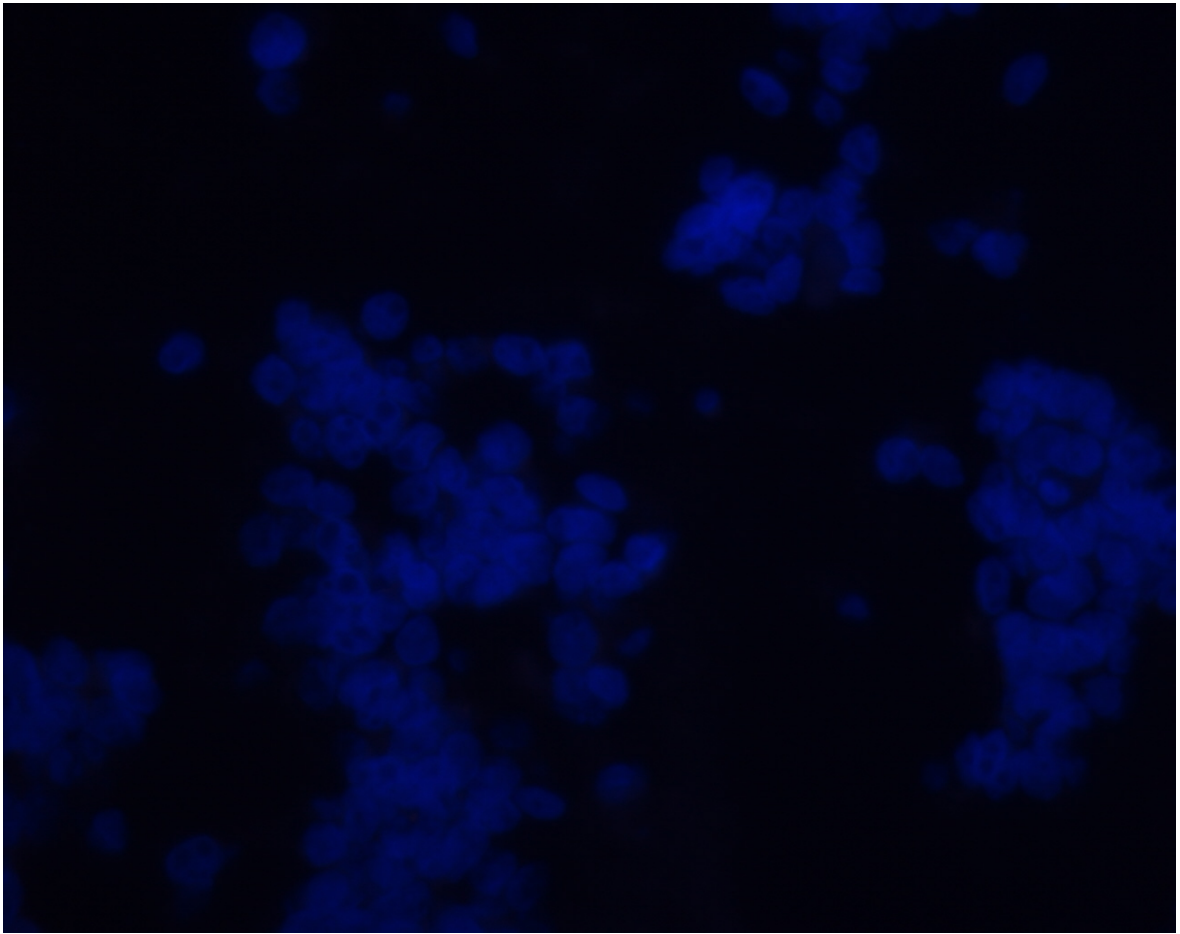


Abb.III.5. FisH- Präparat eines Granulosazeltumors: Floureszenzmikroskopie unter DAPI- Kernfärbung anregenden Filter.



**Abbildung III.6.**

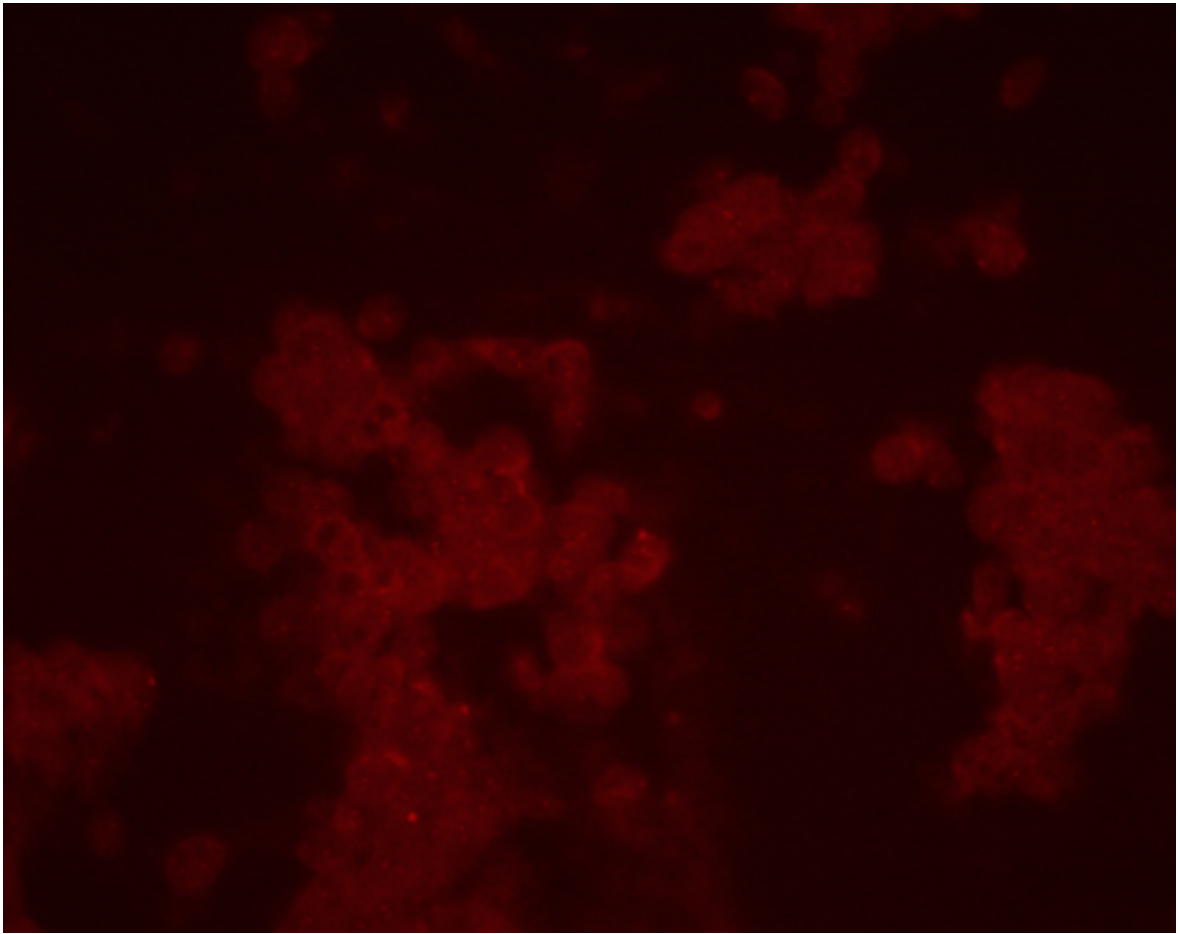


Abb.III.6. selbes Präparat wie in Abb.III.5. unter Sondenfluoreszenzfarbstoff anregenden Filter.

Nach dem verwendeten FISH-Scoring System (siehe Kapitel II.6. Auswertung) konnten in 10 Tumoren (34,5 %) drei Signale in mehr als 10% der ausgezählten Zellkerne und in 19 Präparate (65,5%) in weniger als 10 % oder in keinen der ausgewerteten Zellkerne nachgewiesen werden (siehe Diagramm III.1.).

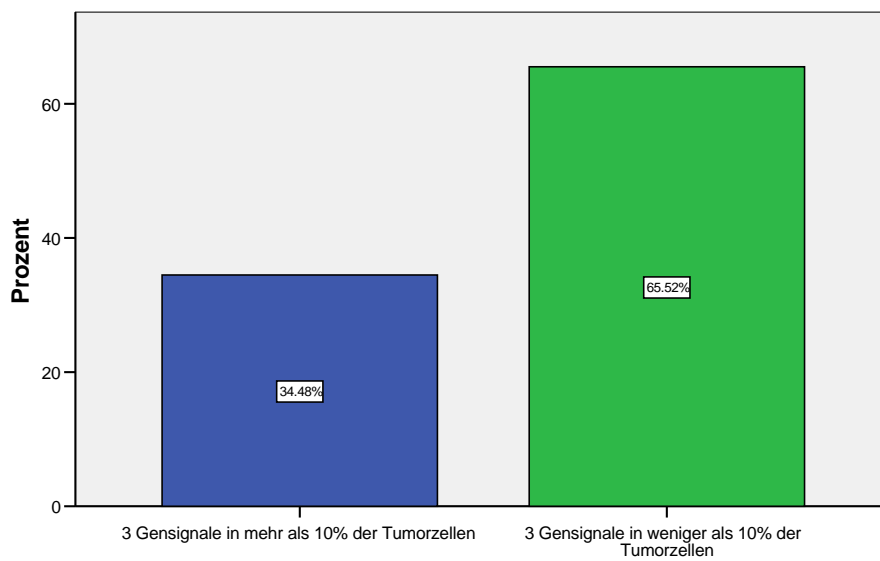


Diagramm III.1.

## 2. Korrelation der FISH-Ergebnisse zur CGH sowie zu bekannten Prognosefaktoren und zum Überleben

### Korrelation zur CGH

Alle sieben Granulosazelltumoren (100%) mit in der CGH nachgewiesenen Zugewinn genetischen Materials auf dem langen q-Arm des Chromosoms 14 hatten in mehr als 10% der ausgewerteten Zellkerne drei Gensignale. Von den restlichen 22 Tumoren ohne 14q-Zugewinn in der CGH, zeigten drei Tumoren (13,6%) in mehr als 10% der Zellen drei Gensignale in der FISH. Die restlichen 19 Tumoren (86,4%) wiesen jeweils drei Gensignale in weniger als 10% auf ( siehe Diagramm III.2. ).

Die Korrelation zwischen CGH und FISH war hoch signifikant ( $p < 0,05$ ).

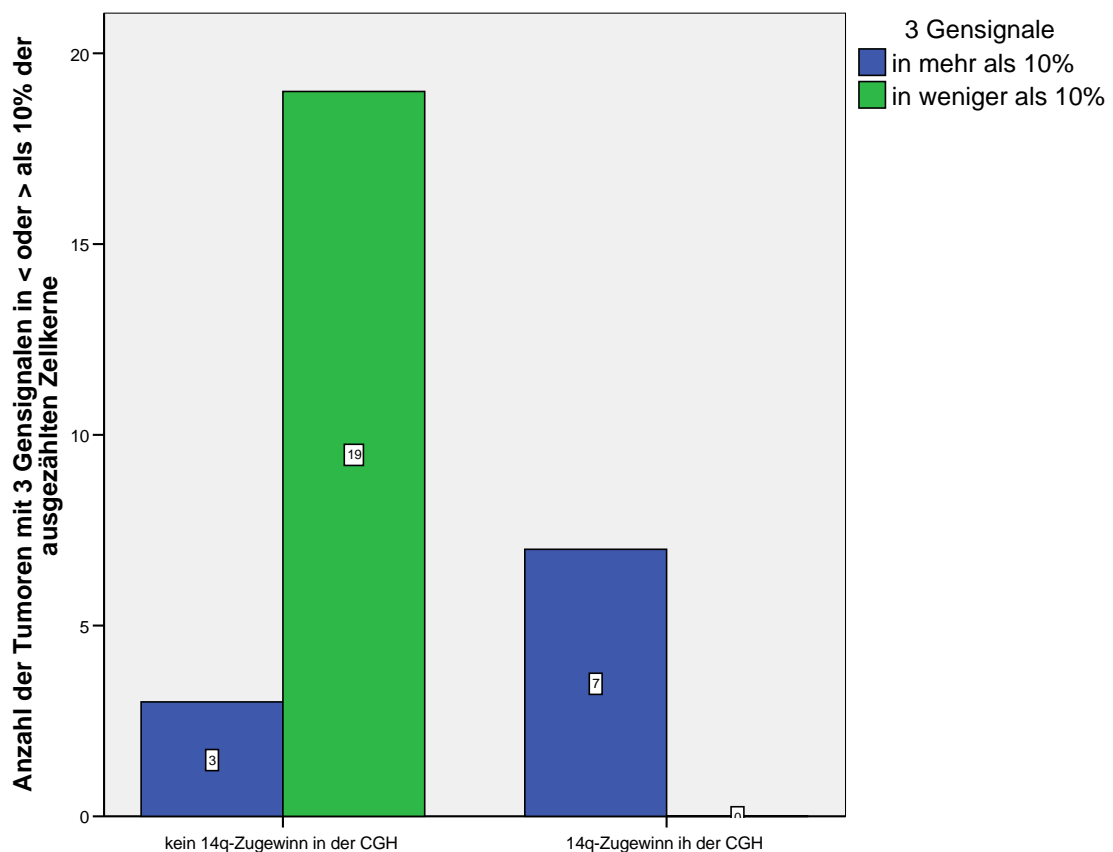


Diagramm III.2. Korrelation der Ergebnisse der Komparativen genomischen Hybridisierung und FISH-Ergebnisse

### Korrelation zum Tumorstadium

Vier der insgesamt 14 FIGO Ia Tumoren (28,6%) zeigten in mehr als 10% der ausgezählten Zellkerne drei Gensignale. Zwei der drei FIGO Ic Tumoren (66,7%) hatten in mehr als 10% der ausgewerteten Kerne drei Signale. Von den insgesamt 11 FIGO IIIc Tumoren konnten in vier Tumoren (36,7%) in mehr als 10% ihrer Zellen drei Gensignale entdeckt werden (siehe Diagramm III.3.).

Eine signifikante Korrelation zwischen Tumorstadium und der Anzahl von Gensignalen konnte nicht gezeigt werden ( $p=1,00$ ).

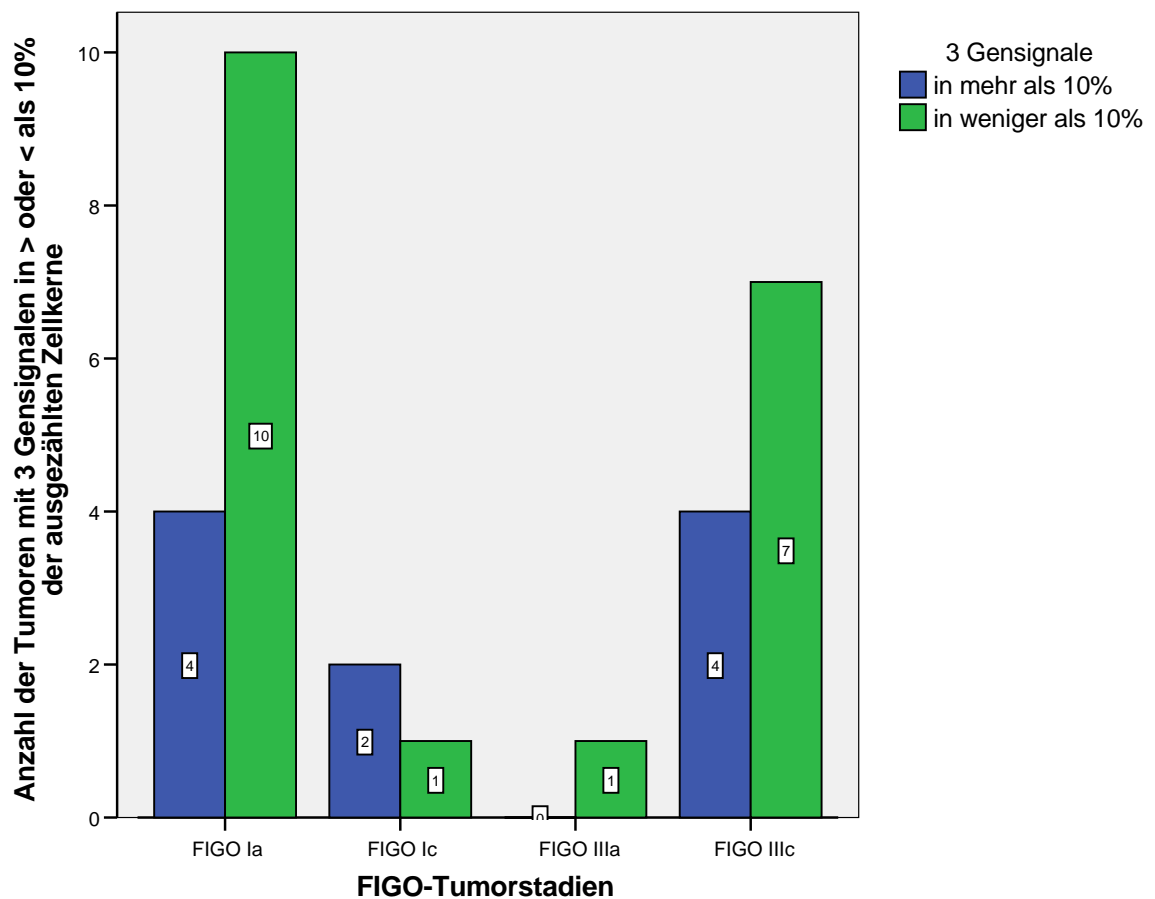


Diagramm III.3. Zusammenhang zwischen FIGO-Tumorstadium und Nachweis von drei Gensignalen

### Korrelation zur Metastasierung

Sechs der insgesamt 17 nicht metastasierten Tumoren (35,3%) hatten in mehr als 10% ihrer Zellen drei Gensignale.

Von den 12 metastasierten Tumoren zeigten vier (33,3%) in mehr als 10% der ausgezählten Zellen drei Gensignale (siehe Diagramm III.4.).

Eine signifikante Korrelation zwischen einer Metastasierung und dem Nachweis von drei Gensignalen in mehr als 10% der Zellen konnte nicht gezeigt werden ( $p = 1,00$ ).

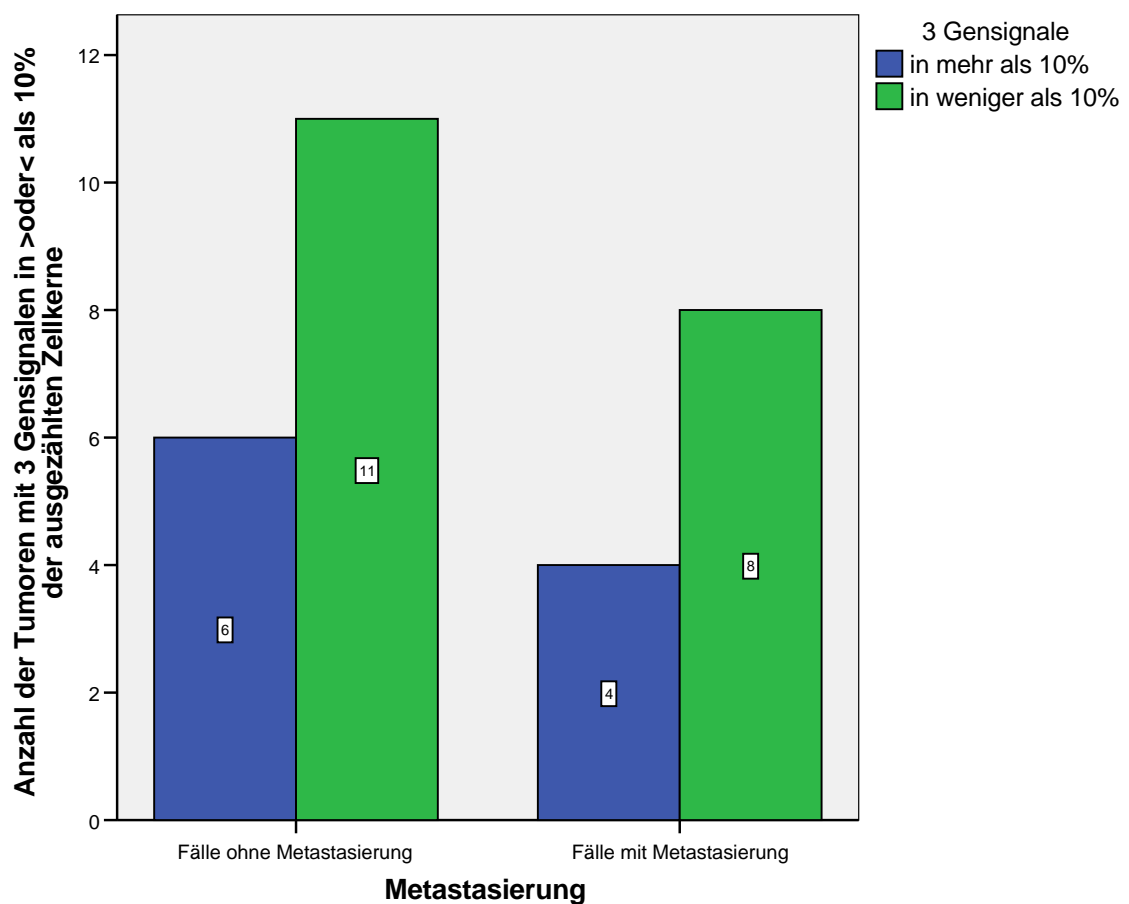


Diagramm III.4. Zusammenhang zwischen Metastasierung und Nachweis von drei Gensignalen

### Korrelation zur Dignitätsabschätzung

Drei der insgesamt 9 als benigne eingestuften Tumoren (33,3%) hatten in mehr als 10% der ausgewerteten Zellkerne drei Gensignale.

Drei der insgesamt 9 als eher maligne beurteilten (33,3%) zeigten auch in mehr als 10% ihrer ausgezählten Zellkerne drei Gensignale.

Vier der insgesamt 11 als maligne eingestuften Tumoren (36,4%) hatten in mehr als 10% ihrer Zellkerne drei Gensignale (siehe Diagramm III.5.).

Ein signifikanter Unterschied zwischen Dignitätsabschätzung und Nachweis von drei Gensignalen errechnete sich nicht ( $p=0,986$ ).

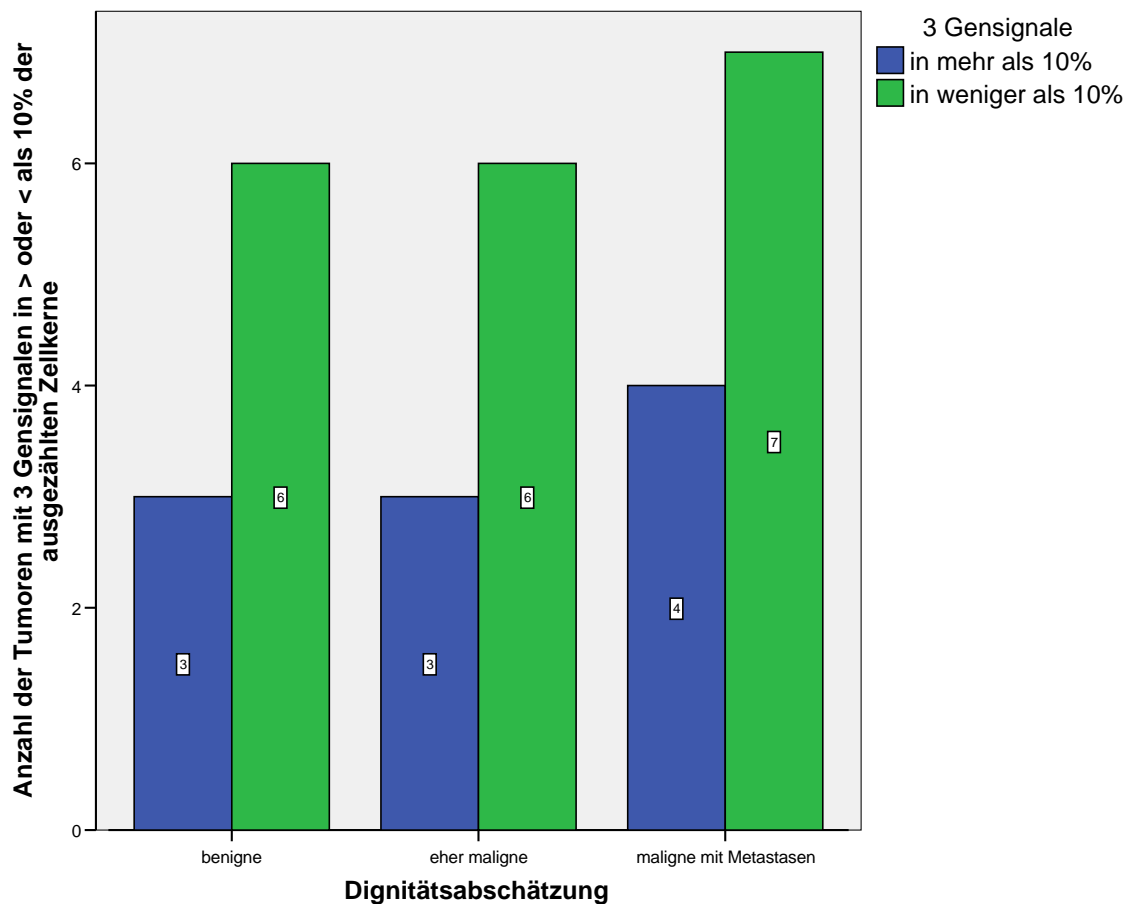


Diagramm III.5. Zusammenhang zwischen Dignitätsabschätzung und Nachweis von drei Gensignalen

### Korrelation zum Patientenalter

In Diagramm III.6. ist das Alter der Patientinnen bei Erstdiagnose des Tumors in Relation zum Auftreten von drei Gensignalen dargestellt.

Eine Tendenz zum häufigeren Auftreten von drei Gensignalen in mehr als 10% der ausgezählten Zellkerne im höheren Alter ist erkennbar.

Eine statistische Signifikanz ergab sich jedoch nicht ( $p=0,54$ ).

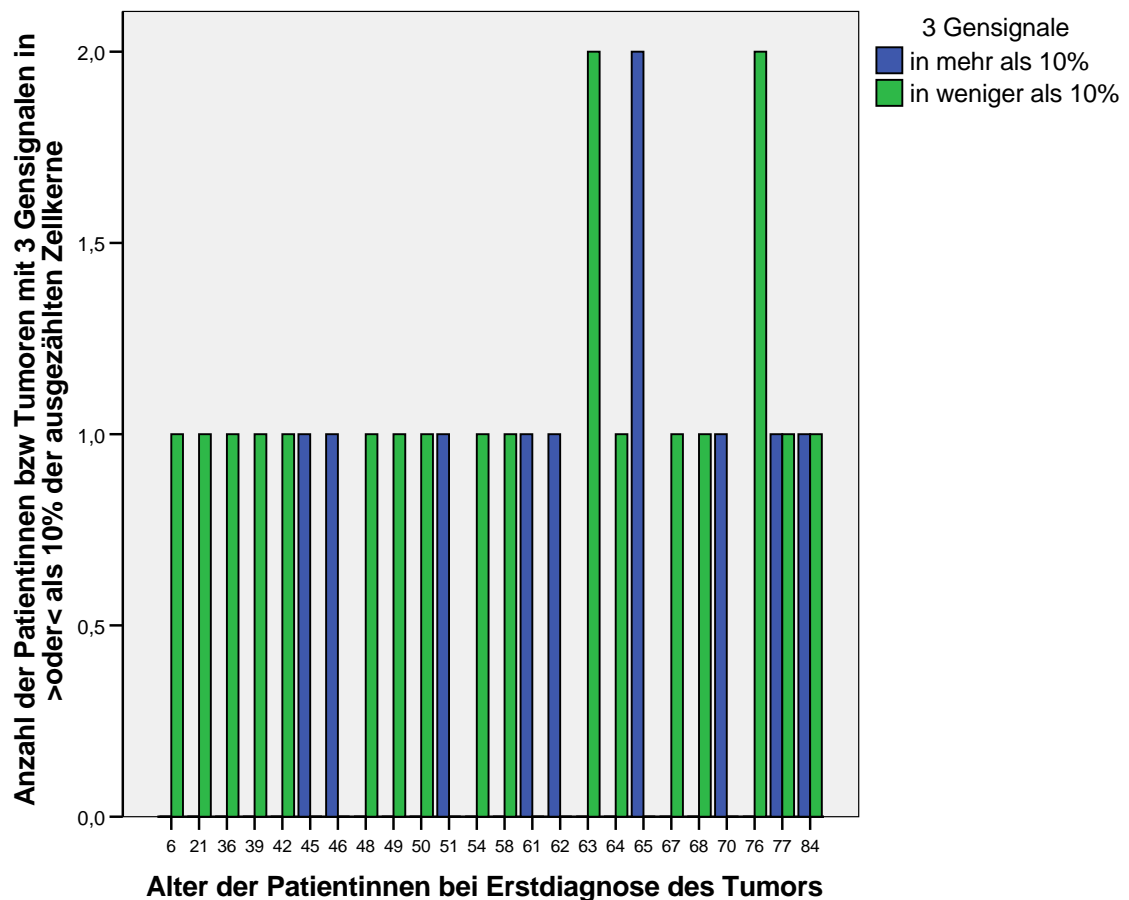


Diagramm III.6. Zusammenhang zwischen Alter der Patientinnen und Nachweis von drei Gensignalen (jeder Balken steht für das Vorkommen des jeweiligen Alters, die langen Balken für das zweimalige Vorkommen desselben Alters)

### Korrelation zur Rezidivrate

Zehn der beobachteten Patientinnen (34,48 %) erlitten ein oder mehrere Rezidive während des Beobachtungszeitraumes. Vier dieser rezidierten Tumoren (40%) zeigten drei Gensignale in mehr als 10% ihrer Zellkerne (siehe Diagramm III.7.).

Eine signifikante Korrelation zwischen Tumorrezidiv und Nachweis von drei Gensignalen in mehr als 10% der ausgewerteten Zellen ergab sich nicht ( $p=0,431$ ).

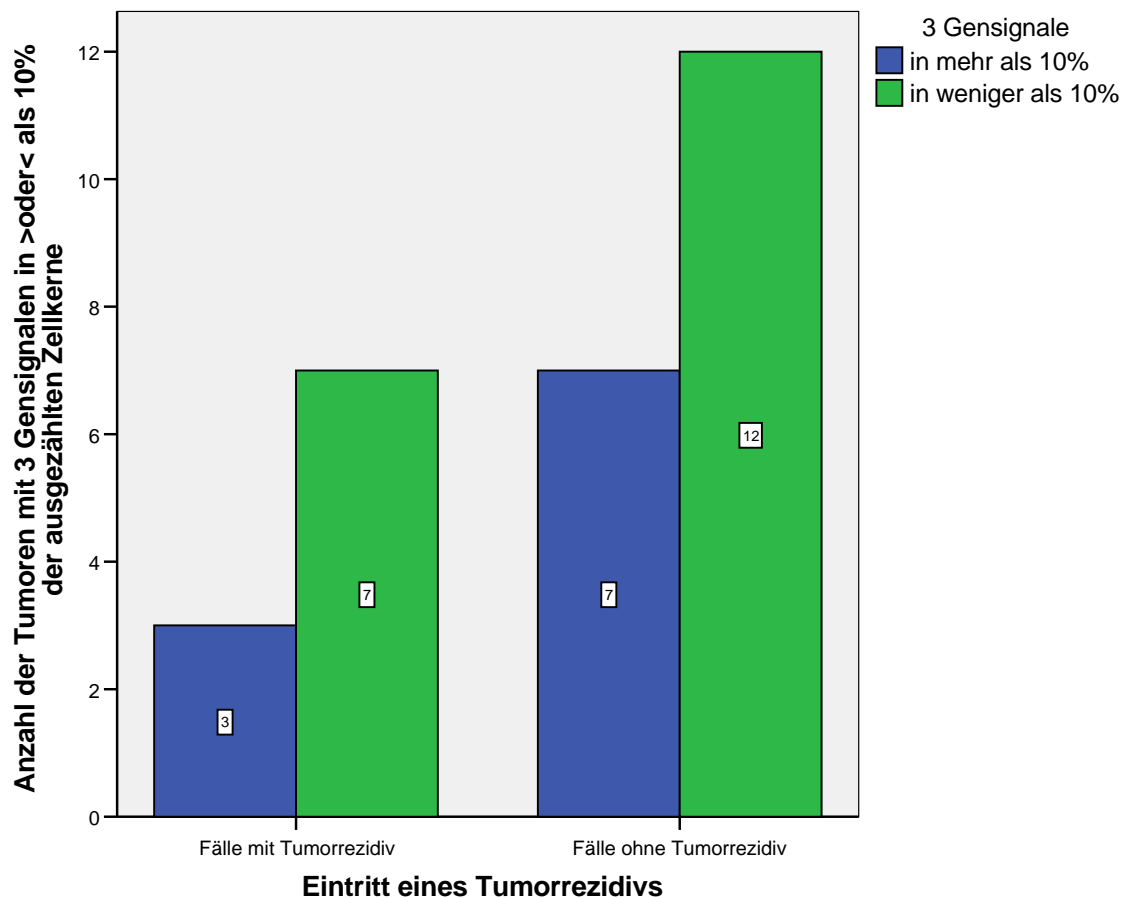


Diagramm III.7. Zusammenhang zwischen Eintritt eines Tumorrezidivs und Nachweis von drei Gensignalen



### Korrelation zum Lebensstatus

Von den insgesamt sechs am Tumor verstorbenen Patientinnen hatte eine Patientin (16,7%) in mehr als 10% der ausgewerteten Tumorzellen drei Gensignale (in der Grafik sind 7 Verstorbene dargestellt unter Einbezug einer tumorunabhängig Verstorbenen).

Sieben der insgesamt 17 beobachteten Überlebenden (41,2%) zeigten drei Gensignale in mehr als 10% der ausgewerteten Zellkerne (siehe Diagramm III.8.).

Ein statistisch signifikanter Unterschied für den jeweiligen Lebensstatus im Hinblick auf die Häufigkeit von Tumoren mit drei Gensignalen in mehr als 10% ihrer Zellkerne war nicht festzustellen ( $p=0.669$ ).

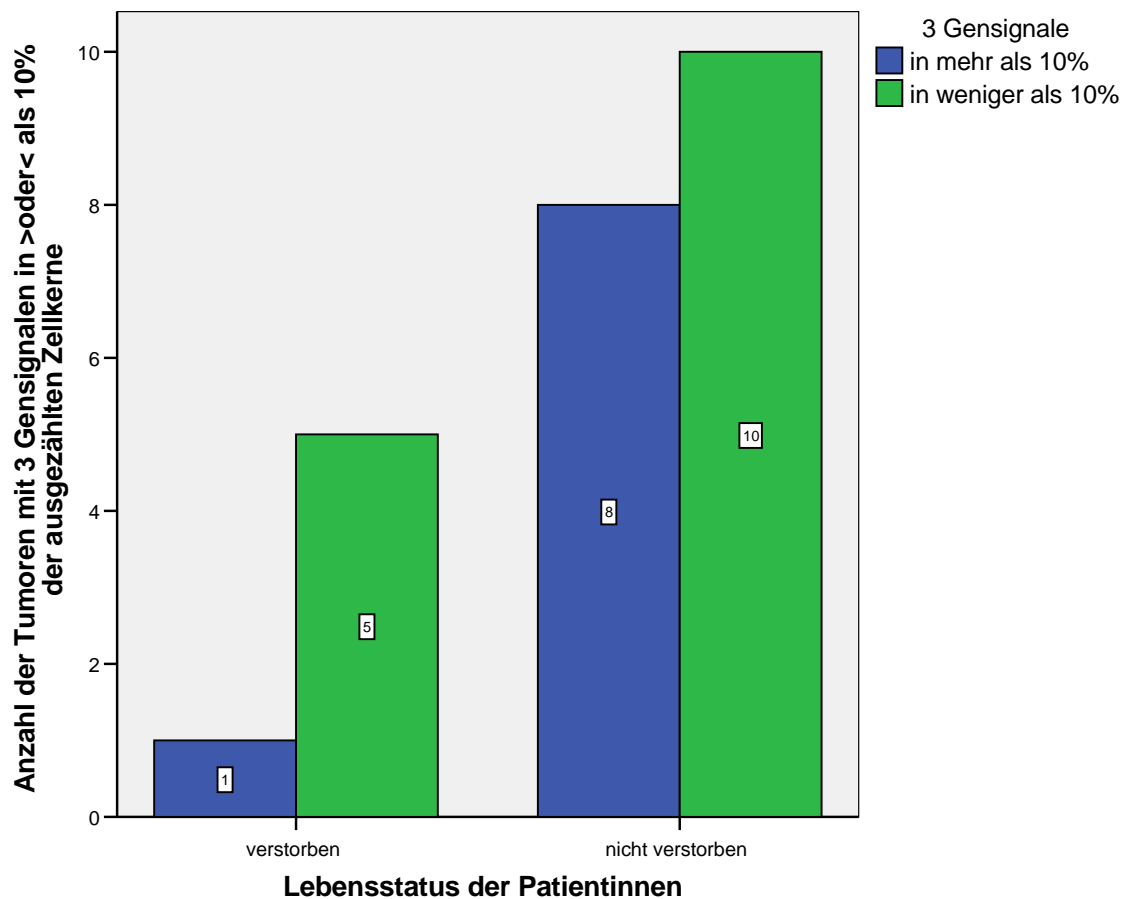


Diagramm III.8. Zusammenhang zwischen Lebensstatus der Patientinnen und Nachweis von drei Gensignalen

### **Korrelation zum Überleben**

Von 24 der 29 Patientinnen existieren klinische Follow-up Daten. Die mittlere Überlebenszeit betrug 154 Monate, die mediane 161 Monate.

Neun dieser Patientinnen (37,5%) hatten in mehr als 10% der ausgezählten Zellkerne drei Gensignale. Die mittlere Überlebenszeit für diese 9 Patientinnen betrug 358 Monate. Nur eine dieser Patientinnen war am Tumor verstorben.

Die restlichen 15 beobachteten Patientinnen (62,5%) hatten in weniger als 10% oder in keinem der ausgewerteten Zellkerne drei Gensignale. Das mittlere Überleben für diese 15 Patientinnen betrug 217 Monate.

Fünf der Patientinnen aus dieser Gruppe (<10%) waren im Verlauf am Tumor verstorben (siehe Diagramm III.9.).

Der log rank Test hinsichtlich einem Unterschied in der Überlebenszeit zwischen den beiden Gruppen war mit  $p = 0,238$  statistisch nicht signifikant.

## Überlebensfunktionen

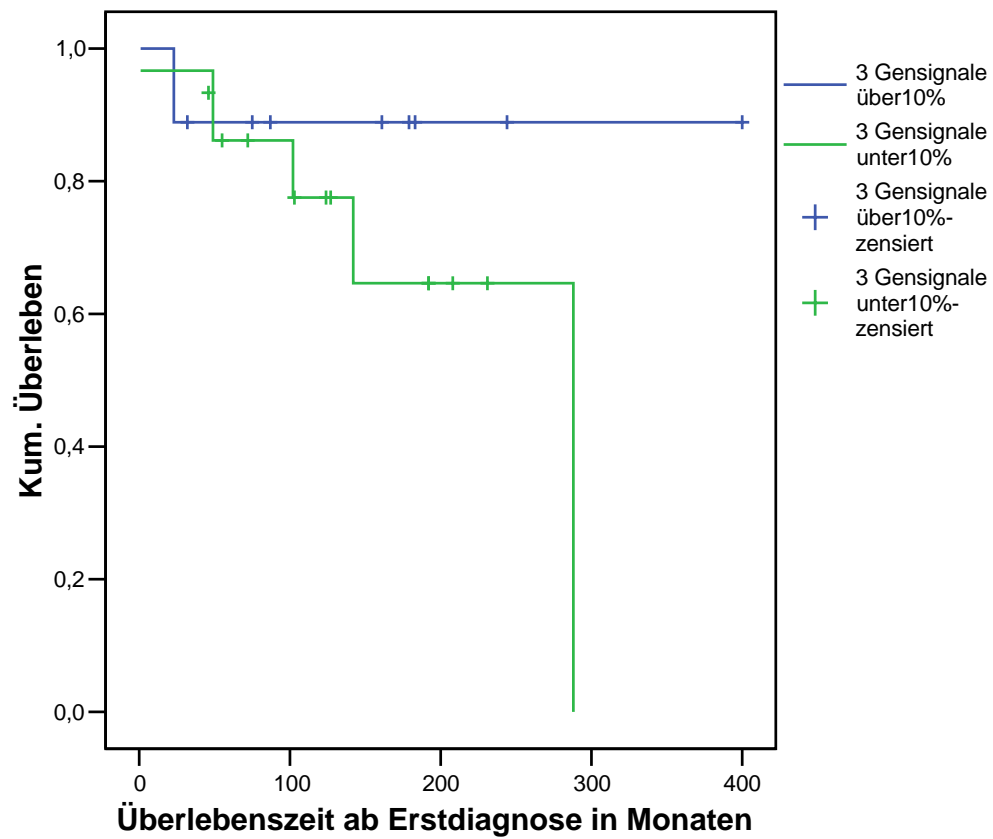


Diagramm III.9. Kaplan-Maier Überlebensfunktion im Bezug auf das Auftreten von drei Gesignalen

#### **IV. DISKUSSION**

Neoplasien werden heute als genetische Erkrankung der somatischen Körperzelle gesehen [13]. Eine Normalzelle transformiert zu einer Tumorzelle und erleidet dabei sukzessive eine unterschiedliche Anzahl von Veränderungen ihres genetischen Materials, welche im Endeffekt zu einer Manifestation des transformierten Phänotyps und zur Bildung von klonalen Linien dieses Typs führen [63, 64, 72].

Bei dieser malignen Transformation spielen verschiedene Kategorien von Zellgenen, die entweder direkt oder indirekt an den Regulationskreisläufen von Zellzyklus, Zelldifferenzierung und Zellproliferation beteiligt sind eine zentrale Rolle, so zum Beispiel die Proto-Onkogene oder die Tumorsuppressorgene. Mutationen ihrer Allele wie Amplifizierungen oder Deletionen oder aber epigenetische Veränderungen wie DNA- De- oder Methylierungen führen zu Funktions- oder Aktivitätsveränderungen des Gens und somit zu Unterbrechungen und Störungen der physiologischen Abläufe dieser Regulationskreisläufe und Signalkaskaden in der Zelle [63, 64, 67].

Mit der Identifizierung genetischer Veränderungen in spezifischen Tumorzellen sowie den damit veränderten Transkriptions- und Expressionsprodukten kann man einerseits frühe diagnostische und prognostische Marker erhalten, aber auch molekulare Angriffspunkte für neue Tumortheraeutika gewinnen [63, 64].

Granulosazelltumoren sind seltene Neoplasien des Ovars. Im Unterschied zu anderen ovariellen Malignomen werden sie aufgrund ihrer hormonalen Aktivität meist im frühen Tumorstadium (FIGO I) entdeckt und zeichnen sich dann nach chirurgischer Resektion durch hervorragende Überlebenszeiten aus. Für Patientinnen mit fortgeschrittenem Tumor oder bei Erleiden eines Tumorrezidivs nimmt die Überlebenszeit jedoch drastisch ab [92, 126]. Demnach werden Tumordignität und Prognose kontrovers diskutiert [92, 126, 100, 115]. Nicht voraussehbare Rezidive [92] mit Auftreten auch erst Jahrzehnte nach der Erstdiagnose werden beschrieben [105]. Im Hinblick auf die Seltenheit der Granulosazelltumoren und der damit verbundenen kleinen Fallzahlen der meisten Studien [126] herrscht auch Uneinigkeit über den Nutzen postoperativer Maßnahmen [92]. Ausser dem Tumorstadium konnten bisher weder klinische noch histologische

Merkmale als aussagekräftige prognostische Indizien für das Verhalten von Granulosazelltumoren identifiziert werden [54, 42].

Die Identifikation von genetischen Veränderungen, die dem Tumorverhalten der Granulosazelltumoren zugrunde liegen, könnte zu einer Optimierung in der diagnostischen sowie therapeutischen Vorgehensweise bei dieser seltenen Tumorart führen. Trotz intensiver Forschung sind bisher die genetischen Mechanismen die für die Initiation und Progression der Granulosazelltumoren verantwortlich sind, noch weitgehend unverstanden [54].

Molekulargenetische Untersuchungen an Granulosazelltumoren konnten zwar eine Vielzahl zytogenetischer Abnormalitäten entdecken, aber für keine dieser Veränderungen konnte bisher eine klinische oder prognostische Relevanz ermittelt werden [54, 37].

Bei epithelialen Ovarialkarzinomen gilt ein nicht diploider Chromosomensatz als Ausdruck der genetischen Instabilität, insbesondere eine Aneuploidität, und spricht für einen aggressiven Tumortyp mit schlechter Prognose [88, 18, 82, 119]. Untersuchungen der Ploidität der DNA von Granulosazelltumoren mittels Flow-Cytometrie und Image-Cytometrie zeigten für mehr als 80% der untersuchten Tumoren einen normalen diploiden Chromosomensatz [139, 65, 59, 133, 100].

Einige Studien räumten diploiden Granulosazelltumoren einen prognostischen Vorteil ein [88, 31, 62, 74, 121]. Jüngere Untersuchungen widerlegten jedoch diese Beobachtung [103, 43, 2, 100] und betonten die geringe Sensitivität der Cytometrie-Methoden zur Aufdeckung quantitativ kleinerer Veränderungen des DNA-Gehaltes [47, 38].

Sensitivere Methoden haben an aneuploiden zytogenetischen Abweichungen in der Erbinformation von Granulosazelltumoren hauptsächlich numerische Chromosomenaberrationen aufgewiesen. Trisomie 12, Trisomie 14 und Monosomie 22 werden am häufigsten erwähnt [46, 65, 140, 100, 37, 94, 105], wobei die Trisomie 14 und die Monosomie 22 überwiegen und als unzufällig häufiges Ereignis in der Tumorgenese von Granulosazelltumoren beschrieben werden [100, 140, 105, 37, 94].

Im Vorfeld zu dieser Arbeit konnten Mayr et al. mit Hilfe der Komparativen genomischen Hybridisierung als Screeningmethode in 24% der Granulosazelltumoren einen spezifischen DNA-Zugewinn der q-Region des Chromosoms 14 nachweisen [100] (siehe Diagramm II.3., Kapitel II Material und Methoden).

Für zahlreiche auf dem Chromosom 14 lokalisierte Gene sind Funktionen und Beteiligungen an der Regulation von Zellproliferation und Zelltod beschrieben [100]. Unter anderen für das auf 14q32.2 gelegene Proto-Onkogen AKT1, das die Serin/Threonin Proteinkinase B = Proteinkinase B alpha (PKB $\alpha$ ) codiert [129].

Im Verlauf des letzten Jahrzehnts wurde erkannt, daß die Proteinkinase B (PKB/AKT1) eine wichtige Rolle im Verlauf der onkogenen Transformation in unterschiedlichen Zelltypen spielt [142, 106].

Intrazellulärer Überbringer extrazellulärer Wachstumsfaktorsignale, Förderer von Zellwachstum und Proliferation und Inhibitor der Apoptose sind einige der erforschten physiologischen Funktionen von AKT1/PKB $\alpha$  [80].

Da die Überrepräsentation von chromosomalen Regionen mit einer Onkogenamplifikation assoziiert sein kann [138], wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob eine Amplifikation des AKT1-Gens an dem von Mayr et al. festgestelltem Zugewinn genetischen Materials am langen q Arm des Chromosom 14 beteiligt ist.

Das AKT1-Gen wurde dabei aber nicht nur wegen seiner Lokalisation auf dem 14q-Arm in den Mittelpunkt dieser Arbeit gestellt, sondern auch weil seine bekannte Schlüsselrolle als Inhibitor der Apoptose [106, 54, 80] auch in der Tumorgenese ovarieller Neoplasien von Bedeutung sein könnte.

Analog zum hypothetischen Konstrukt zur Pathogenese epithelialer Ovarialkarzinome, das davon ausgeht, dass es während der Heilung der durch die Ovulation entstandenen epithelialen Defekte zu DNA-Replikationsfehlern kommt, die letztlich auch zu einer Fehlfunktion der Apoptoseinduktion führen [44, 125], kann man auch bei der Granulosazelltumorgenese von einer fehlgelaufenen Follikelatresie ausgehen [54]. Alterationen des Zellapoptoseinhibitors AKT1 tragen somit möglicherweise entscheidend zur Tumorpathologie der ovariellen Granulosazelltumoren bei [54].

Darüberhinaus wird angenommen, daß die AKT1-Regulierung östrogenabhängig ist. In Endometriumszellen führte eine Östrogenstimulation zu einer signifikanten Erhöhung der AKT1-Aktivität mit Entwicklung onkogener Potenz [85].

Erhöhte Östrogenserumspiegel sind geradezu pathognomisch für die steroidhormonproduzierenden Granulosazelltumoren [8], und auch unter diesem Aspekt wurde die mögliche Relevanz des AKT1-Onkogens für die Tumorprogression der Granulosazelltumoren in Erwägung gezogen. Denn Aktivitätserhöhungen

onkogenspezifischer Enzyme sind nicht selten mit einer Amplifikation und Expressionssteigerung des encodierenden Gens assoziiert [101, 147].

So wurden auch die Tumoren, die in der Komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) keinen 14q-Zugewinn aufwiesen, in der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung mit DIG-markierten AKT1-Gensonden untersucht, um mittels dieser sensitiveren Methode mit höherer Basenpaarauflösung als bei der CGH, eine etwaige Amplifikation der AKT1-Region aufzudecken, die in der CGH nicht detektiert worden ist [117, 81].

Die Amplifikation von Onkogenen ist ein häufiger Mechanismus der Tumorprogression in soliden Tumoren. Der Grad der Genvervielfältigung kann für manche Malignome als signifikanter prognostischer Marker der Aggressivität ihres Wachstumsverhaltens dienen und somit zur Therapieplanung einen wichtigen Beitrag leisten, so z. B. die Her2/neu Amplifikation beim Mammakarzinom [101]. Darüberhinaus können amplifizierte Onkogenprodukte auch als therapeutisches Zielmolekül monoklonaler Antikörper fungieren, so wird beispielsweise der Her2/neu Rezeptor durch Trastuzumab inhibierend gebunden [147]. Auch für die AKT1-Proteinkinaseaktivität existieren potente molekulare Inhibitor, die bereits in zahlreichen Studien erfolgreich eine Tumorzellreduktion initiieren konnten [60, 108, 98, 5, 7].

Obwohl in einer Vielzahl von Tumoren erhöhte AKT1/PKB $\alpha$ -Kinaseaktivitäten gemessen wurden [134, 143, 52,], konnten Amplifikationen des AKT1-Gens bisher in nur einer Studie nachgewiesen werden. Diese beschrieb die 20-fache Erhöhung der AKT1-Genkopienzahl in einem menschlichen Adenokarzinom und postulierte somit eine Beteiligung des AKT1-Onkogens an dessen Tumorgenese [128].

Amplifikationen der AKT2- und AKT3-Isoformen sind bereits in einer Vielzahl von Neoplasien entdeckt worden [11, 29, 28, 122, 138]. Da beide Onkogene nicht auf dem Chromosom 14 lokalisiert sind wurde in dieser Arbeit nicht auf mögliche Amplifikationen dieser Isoformen hin untersucht.

Ruggeri et al. [122] konnte für eine AKT2-Amplifikation in duktalem Pankreaskarzinomen, und Cheng et al. [28], Thompson et al. [138] sowie Bellacosa et al. [11] für die AKT2-Amplifikation in epithelialen Ovarialkarzinomen Korrelationen zu höheren Tumorstadien feststellen.

Im Gegensatz zu unserer Studie wurden diese Amplifikationen meist mittels der Methode des Southern Blots nachgewiesen, wobei die Genkopien-Zahl des untersuchten Gewebes in Relation zu Normal-DNA gesetzt wurde. Bei der von uns verwendeten Methode der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung hingegen wurden direkt Genkopien einzelner Zellen sichtbar gemacht und dann ausgezählt [6].

FISH- Untersuchungen zur Amplifikationsentdeckung des AKT1-Onkogens, wie in unserer Versuchsordnung sind in der Literatur nach unserem besten Wissen bisher nicht beschrieben.

Die Auswertung unserer Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung ergab, daß in allen 29 Fällen unseres Tumorkollektivs kein Zellkern mehr als drei Gensignale hatte.

Dies bedeutete, daß in keinem der ausgewerteten Interphase-Zelkerne mehr als eine zusätzliche Genkopie nachzuweisen war, wobei das disome Auftreten von single-copy-Genen, wie das AKT1-Gen eines ist, normal wäre [69].

Eine hochgradige Amplifikation des AKT1-Onkogens, wie in der Studie von Staal et al. [128] beschrieben, war somit in keinem dieser Granulsazelltumoren aufgetreten.

Dieses Ergebnis spricht auch gegen eine AKT1-Amplifikation als Ursache des in der Komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) konstatierten Basenpaarzugewinns am q-Arm des Chromosoms 14. Erst eine hochgradige Vervielfältigung der ca 150kb langen verwendeten AKT1-Sondensequenz wäre bei der Sensitivität der CGH als Zugewinn gentischen Materials detektiert worden [117, 81].

Da höchstens nur eine zusätzliche Genkopie in allen Tumorzellkernen aufgetreten ist, ist das in der CGH zusätzlich aufgetretene DNA-Material nicht erklärt.

Thompson et al. [137, 138] hingegen war es gelungen, der Aufgabenstellung unserer Arbeit entsprechend, die vermutete Vervielfältigung eines spezifischen Onkogens innerhalb einer chromosomalen Überrepräsentation aufzuweisen.

Zunächst hatte er Veränderungen auf Chromosom 19 als häufiges Ereignis in der Tumorgenese epithelialer Ovarialkarzinome identifiziert [137].

Mit Hilfe von FISH-Untersuchungen an Ovarialkarzinomzelllinien mit Whole Chromosome 19 Painting DNA-Proben, also der gesamten Chromosom-19-Sequenz, konnten große vervielfältigte Chromosom 19 Abschnitte nachgewiesen werden.



FISH-Untersuchungen mit der 19q13.1-19q13.2-Sequenz als Sonden-DNA zeigten, daß in 65% der Fälle mit Chromosom19-Vervielfältigung, eine signifikante Überrepräsentation dieser Chromosomenregion bestand.

19q13.1-19q13.2. beinhaltet den AKT2-Genlokus. Southern Blot Untersuchungen der Tumorzell-DNA in Relation zu normaler Ovar-DNA mit AKT2-Gensonden zeigten, daß diese chromosomale Überrepräsentation mit einer AKT2-Amplifikation vergesellschaftet war sowie mit einer Überexpression der AKT2 mRNA.

Die Echtheit der AKT2-Amplifikation und Ausschluss einer Polysomie, die wie in unseren Präparaten mit 14q-Zugewinn ebenfalls zu erhöhten Kopienzahl führt, erfuhr Thompson et al., aus den Southern Blot-Untersuchungen mit dem ebenfalls auf 19q13.1-19q13.2. lokalisierten ERCC-2 DNA-Reperaturgen, die für diesen keine erhöhte Kopienzahl ergaben. [138]

Thompson et al. war es somit gelungen innerhalb der chromosomalen Überrepräsentation von 19q eine Onkogenvervielfältigung zu identifizieren, und somit die Beteiligung dieses Onkogens an der Tumorgenese der untersuchten Ovarialkarzinomzellen zu postulieren. Andere und nachfolgende Studien bestätigten das Auffinden von AKT2-Amplifikationen und Überexpressionen in epithelialen Ovarialkarzinomen und formulierten gar einen Zusammenhang von diesen zu höheren Tumorstadien [28, 29, 11].

Da bei den Granulosazelltumoren keine häufigen Chromosom19-Zugewinne in der CGH nachzuweisen waren, scheint eine Amplifizierung des auf 19q12.1-19q13.2 lokalisierten AKT2-Onkogens für ihre Genese eine untergeordnete Rolle zu spielen.

In Arbeiten anderer Autoren wird eine in der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung nachgewiesene Genamplifizierung bzw. ein Zugewinn genetischen Materials dann als signifikant für den Tumor angesehen, wenn in mindestens 10% der ausgewerteten Zellen genetische Auffälligkeiten entdeckt worden sind [1, 110].

Analog zu diesen Scoring Kriterien von Abel et al. und Pauletti et al., führten wir eine Einteilung der ausgewerteten Tumoren durch, in solche die in mehr als 10% der ausgezählten Zellkerne drei Gensignale hatten, und somit in mehr als 10% der Tumorzellen eine zusätzliche AKT1-Genkopie besaßen, und in solche Tumoren die in weniger als 10% oder in keinen ihrer Zellen drei Gensignale hatten (siehe Kapitel III. Ergebnisse, Diagramm III.1).

Zur Ermittlung statistischer Signifikanzen für das Auftreten von drei Gensignalen in den Tumoren, korrelierten wir diese Ergebnisse mit klinischen und prognostischen Parametern (siehe Kapitel III. Ergebnisse, Diagramm III.2-9).

10 der insgesamt 29 Tumoren (34,5% ) zeigten in mehr als 10% ihrer Zellkerne drei Gensignale. Sieben dieser Tumoren waren jene die in der Komparativen genomischen Hybridisierung am langen q-Arm des Chromosoms 14 den DNA-Zugewinn zeigten. Wie bereits im Zusammenhang zur Studie von Thompson et al. diskutiert, spricht unsere Arbeit nicht für eine Amplifikation des AKT1-Gens innerhalb dieses chromosomalen Zugewinns. Unsere Ergebnisse der FISH bestätigen jedoch die CGH-Ergebnisse dieser sieben Tumoren und zeigen, daß die AKT1-Gensequenz als Bestandteil des 14q - Chromosoms an dieser chromosomalen Überrepräsentation beteiligt ist.

Analog zu den Studien von Mayr et al. [100] sowie Lin et al. [94], die für den Zugewinn des Chromosom 14 keine prognostische Signifikanz feststellten, berechneten wir bezüglich des Auftretens von drei Gensignalen auch keine signifikante Korrelationen zu FIGO-Tumorstadium, Metastasierung, Dignitätsabschätzung, Alter der Patientinnen, Rezidivgeschehen, Lebensstatus und Überlebenszeit der Patientinnen (siehe Kapitel III. Ergebnisse, Tabellen III. 2.-9.).

Anders stellte sich die Situation für die restlichen drei Tumoren dar, die in mehr als 10% ihrer ausgezählten Zellkerne drei Gensignale aufwiesen und die in der CGH hinsichtlich eines Zugewinns von 14q völlig unauffällig waren (Fall. Nr. 2, 6, 20).

Fall Nr. 6 und 20 zeigten in der CGH gar ein völlig normales Karyogramm (siehe Kapitel II. Material und Methoden, Tabelle II.2.).

Bei diesen Fällen konnte man tendenziell von einer echten Amplifikation nur des Sondenabschnittes ausgehen, dessen Basenpaarlänge nicht groß genug gewesen ist um von der weniger sensitiven CGH mit einem Auflösungsvermögen von 2 Mb bis 50kb für hochamplifizierter Bereiche [ 117], erfasst zu werden.

Um zu verifizieren, daß es sich hierbei um eine Vervielfältigung nur der SONDENSEQUENZ handelt, wären weitere Untersuchungen erforderlich, die analog zu Chromosomen-Mikrodissektionen [114] oder analog zu dem Versuchsaufbau von Thompson et al. [138] die Amplifikation der DNA-Regionen, die ober- und unterhalb des für AKT1

codierenden Abschnitts ansetzen ausschliessen müssten und somit eine partielle Polysomie ausschliessen.

Für diese drei Tumoren konnten wir, wie auch für alle anderen Tumoren, die in mehr als 10% ihrer Zellkernen drei Gensignale hatten, keinerlei signifikante Korrelationen zu FIGO-Stadium, Metastasierung, Dignitätsabschätzung, Rezidivgeschehen, Alter der Patientinnen, Lebensstatus und Überlebenszeit feststellen (siehe Kapitel III. Ergebnisse Diagramm III.2.-9.), sodaß die Bedeutung der entdeckten zusätzlichen Genkopie wahrscheinlich sekundärer Natur ist.

Auch weil die bisher in der Literatur einzig beschriebene Amplifikation des AKT1-Gens in einer menschlichen Neoplasie eine 20-fache Erhöhung der Genkopienzahl darstellt [128] bleibt es fraglich, ob eine moderate Vervielfältigung um eine zusätzliche Kopie einen Beitrag zur Tumorgenese leistet.

Diese Arbeit konnte zeigen, daß die beschriebene chromosomale Überrepräsentation von Chromosom 14 in Granulosazelltumoren [46, 65, 100, 140, 105, 37, 94], in den von uns untersuchten Tumoren nicht mit einer Amplifikation des auf 14q32.2 lokalisierten Onkogens AKT1 [129] assoziiert ist.

Auf dem 14q-Chromosom sind ausser dem AKT1-Onkogen noch weitere für Zellproliferation und Zelltod wichtige Gene beschrieben, wie zum Beispiel das FOS-Gen, die Hauptkomponente des Activator Protein 1 (AP1)-Transkriptions-Faktor-Komplexes, das BCL2L2 (BCL2like2)-Gen, ein wichtiger Regulator der Apoptose oder das TGFβ3-Gen, welches Zelldifferenzierung und-proliferation kontrolliert [100].

Die Untersuchung der möglichen Amplifizierung dieser Onkogene als Bestandteil des zusätzlichen genetischen Materials der 14q-Chromosomenregion steht noch aus.

Insgesamt geben die Untersuchungsergebnisse unserer Arbeit Anlaß zur Hypothese, daß eine Amplifikation des AKT1-Onkogens und somit eine Vermehrung der AKT1-Genkopienzahl an der Pathogenese von Granulosazelltumoren nicht beteiligt ist.

Das Auftreten von drei Gensignalen und somit das Vorhandensein einer zusätzlichen AKT1-Genkopie zeigte keine statistische Signifikanz zu prognostischen oder klinischen Parametern, weder in den Tumoren für die das Auftreten von drei Gensignalen auf die bereits in der CGH detektierten 14q-Aneuploidität zurückzuführen war, noch für die anderen Tumorpräparate ohne 14q-Zugewinn.

Die Rolle des AKT1-Gens für die Transformation von Granulosazellen im Hinblick auf seine Expression, seiner Aktivierung und seiner Proteinkinaseaktivität im Geflecht der molekularen Signalwege bleibt weiterhin ungeklärt.

Neben der Amplifikation existieren auch andere molekulare Mechanismen, welche die Funktion eines Proto-Onkogens in die eines transformierenden Onkogens verwandeln, wie zum Beispiel durch Veränderungen innerhalb der Basensequenz durch Genfusion, chromosomale Translokation, Punktmutationen oder aber durch epigenetische Veränderungen [128, 63].

Das Onkogenprodukt selbst, im Falle des AKT1-Onkogens die Proteinkinase B  $\alpha$ , unterliegt als Mitspieler diverser komplexer Signalkaskaden wiederum einer Vielzahl anderer beeinflussender Faktoren, die seine transformierende Eigenschaften bestimmen [106].

So ergibt sich eine Vielzahl von möglichen Veränderungen innerhalb des AKT1-Gens, der Proteinkinase B $\alpha$  sowie in seinen Signalwegen, die seine maligne Potenz beeinflussen [106].

Fuller und Chu weisen darauf hin, daß bis dato mögliche Veränderungen des AKT1-Signalwegs in Granulosazelltumoren weder auf genetische Mutationen, noch auf Überexpressionen oder auf Kinaseaktivitätserhöhungen hin untersucht worden sind [54].

Experimentell konnten einer durch Punktmutation hergestellte Mutante des AKT1-Onkogens transformierende Wirkungen nachgewiesen werden [9].

Zahlreiche Arbeiten haben in diversen anderen Neoplasien erhöhte AKT1-Enzymaktivitäten gemessen, die teilweise auch signifikant mit höheren Tumorstadien korrelierten ohne Alterationen auf genetischer Ebene oder in der Proteinexpression zu zeigen [134, 52, 143]. Zinda et al gehen davon aus, daß dem Grad der AKT1-Kinaseaktivität größerer Bedeutung für das maligne Verhalten von Zellen zukommt, als genetischen Modifizierungen wie einer Amplifikation oder Expressionssteigerung, und zudem auch unabhängig von diesen ist [151].

So konnte unsere Studie zwar die genetische Alteration einer Amplifikation des AKT1-Onkogens an den von uns untersuchten 29 Granulosazelltumoren ausschliessen, aber erst Untersuchungen der Expression und Enzymaktivität des AKT1-Onkogens könnten seine Rolle in der Pathogenese der Granulosazelltumoren genauer bestimmen.

Als Ausblick für zukünftige Arbeiten ist zu sagen, daß die chromosomale Überrepräsentation des 14q-Chromosoms als Ausgangspunkt unserer Arbeit noch weiterer Untersuchungen bedarf, um sowohl ihre einzelnen Bestandteile zu entschlüsseln als auch ihre Bedeutung in der Tumorgenese der Granulosazelltumoren zu erkennen.

Zu klären inwieweit das AKT1-Gen unabhängig von einer Amplifizierung an einer Transformierung von Granulosazellen beteiligt ist, wird noch intensive Forschung erfordern.

## V. ZUSAMMENFASSUNG

Granulosazelltumoren sind seltene Neoplasien des Ovars, die zur Gruppe der Keimstrangstromatumoren gehören und innerhalb dieser Gruppe mit circa 80% die häufigste Variante darstellen. Von den klassischen Ovarialkarzinomen unterscheiden sie sich, unter anderem durch ihre häufige Hormonaktivität und ihre unklare Dignität mit der Gefahr einer späten Rezidivierung bzw. Metastasierung.

Die Ätiologie und Pathogenese der Granulosazelltumoren ist nach wie vor unbekannt.

Trotz intensiver Forschung existieren, außer dem Tumorstadium, bisher keine sicheren klinischen oder histopathologischen Parameter, die eine sichere Prognoseabschätzung zulassen würden.

Tumordignität und Prognose werden daher kontrovers diskutiert.

Da heute jegliche Neoplasie als Folge einer Serie genetischer Veränderungen gesehen wird, wäre die Kenntnis der molekularen Mechanismen, die der onkogenen Transformation und Progression von Granulosazelltumoren unterliegen, von großem Interesse, nicht nur zur Identifizierung prognostischer Marker, sondern auch von Zielmolekülen für neue molekularpharmakologische Therapeutika.

Für die hier vorliegende Arbeit stand Material von 29 Patientinnen mit Granulosazelltumoren, die in den Jahren 1970-2002 in der Abteilung für Gynäkologie des Klinikums Großhaderns der LMU München chirurgisch behandelt wurden, zur Verfügung. In 24 Fällen (82.75%) lagen Daten sowohl des klinischen Verlaufs, als auch zum Langzeitüberleben vor.

Molekulargenetische Untersuchungen an Granulosazelltumoren ergaben, daß neben anderen zytogenetischen Abweichungen, eine Trisomie 14 eine charakteristische chromosomale Aberration in Granulosazelltumoren darstellt. Mit Hilfe der komparativen genomischen Hybridisierung konnten bei 24% der in dieser Arbeit untersuchten Tumoren ein Zugewinn genetischen Materials am langen q-Arm des Chromosoms 14 festgestellt werden (siehe Kapitel II. Material und Methoden, Diagramm II.3.).

Dabei stellte sich die Frage ob diese chromosomale Überrepräsentation von 14q mit einer Amplifikation eines für die Tumorprogression wichtigen Onkogens assoziiert ist.

Das AKT1-Onkogen ist auf Chromosom 14q32.2 lokalisiert.

Als Transduktor von Wachstumsfaktorsignalen, Proliferations- und Zellteilungsförderer und Inhibitor der Apoptose spielt AKT1 im Verlauf der onkogenen Transformation in unterschiedlichen Zellen eine zentrale Rolle.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung mit selbst hergestellten, DIG-markierten Gensonden, AKT1 als möglicher Prognosemarker untersucht. Hierzu wurden statistische Berechnungen der FISH-Ergebnisse mit den zur Verfügung stehenden klinischen Daten, Überlebensdaten und histologischen Parametern durchgeführt.

Bei der Auswertung der Präparate zeigte sich, daß in keinem Zellkern des gesamten Tumorkollektivs mehr als drei Gensignale vorhanden waren.

Da somit in allen Zellkernen aller Tumoren höchstens nur eine zusätzliche AKT1-Genkopie detektiert worden ist, spricht dieses Ergebnis gegen eine AKT1-Amplifizierung und erklärt nicht allein den in der CGH konstatierten Zugewinn genetischen Materials auf dem 14q-Chromosom. Die FISH-Ergebnisse bestätigen jedoch die bereits im CGH-Screening nachgewiesene numerische Aberration des Chromosoms 14 mit dem AKT1-Onkogen als Bestandteil dieses Chromosoms.

Zur Quantifizierung der Ergebnisse wurden die Tumoren in solche eingeteilt, die in mehr als 10% ihrer Zellkerne drei Gensignale hatten und solche, die in weniger als 10% oder in keinen der ausgewerteten Zellkerne drei Gensignale zeigten.

Dabei hatten alle sieben Tumoren, die in der CGH einen 14q-Zugewinn aufwiesen, in über 10% der Zellkerne drei Gensignale. Dies bestätigt nochmals die bereits festgestellte 14q-Aneuploidität mit dem AKT1-Gen als Bestandteil des zugewonnenen genetischen Materials.

Die übrigen drei Tumoren, die in mehr als 10% ihrer Zellen drei Gensignale aufwiesen hatten in der CGH am 14q-Chromosom keinen Zugewinn gezeigt.

Bei diesen drei Tumoren müssten weitere molekulare Untersuchungen durchgeführt werden, um nachzuweisen, ob es sich bei dem Anteil von drei Gensignalen um eine

echte Vervielfältigung, um eine zusätzliche Kopie nur des Sondenabschnitts oder um eine partielle Polysomie handelt, die zu kurz gewesen ist, um von der CGH detektiert zu werden.

Das Auftreten von drei Gensignalen zeigte keine statistische Signifikanz zu prognostischen oder klinischen Parametern, weder in den Tumoren für die das Auftreten von drei Gensignalen auf die bereits in der CGH detektierten 14q-Aneuploidität zurückzuführen war, noch für die anderen Tumorpräparate ohne 14q-Zugewinn.

Insgesamt geben die Untersuchungsergebnisse unserer Arbeit Anlaß zur Hypothese, daß eine Amplifikation des AKT1-Onkogens und somit eine Vermehrung der AKT1-Genkopienzahl nicht alleine an der Pathogenese von Granulosazelltumoren beteiligt ist. In der weiteren Annahme, daß sich hinter der Überrepräsentation des 14q-Arms eine Onkogenamplifikation verbirgt, wären zusätzliche Untersuchungen auf Amplifikationen anderer auf 14q lokalisierter Onkogene sinnvoll, wie z.B. TGF $\beta$ 3, BCL2L2 oder FOS.

Da jüngere Studien der AKT-Aktivität eine wichtigere Rolle in der malignen Transformation von Zellen als dem Gen- oder Expressionstatus zuschreiben, und man davon ausgehen muß, daß die Aktivität der AKT/PKB-Isoformen unabhängig vom Gen- und Expressionstatus ist, bleibt die Bedeutung von AKT1 in Granulosazelltumoren noch weitgehend ungeklärt.



## VI. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 **Abel F., Ejekär K., Kogner P., Martinsson T., (1999):** Gain of chromosome arm 17q is associated with unfavourable prognosis in neuroblastoma, but does not involve mutations in the somatostatin receptor 2 (SSTR2) gene at 17q24. *Brit J Cancer*, 1999;81 (8):1402-1409
- 2 **Ala-Fossi S., Maenpaa J., Aine R., Koivisto A. M., Punnonen R., (1997):** Prognostic significance of p53 expression in ovarian granulosa cell tumors. *Gynecol Oncol*, 1997;66:475-479
- 3 **Altomare D. A., Guo K., Cheng J. Q., Sonoda G., Walsh K., Testa J. R., (1995):** Cloning, chromosomal localization and expression analysis of the mouse Akt2 oncogene. *Oncogene*, 1995, 11;1055-1060
- 4 **Altomare D. A., Lyons G. E., Mitsuuchi Y., Cheng J. Q., Testa J. R., (1998):** Akt2 mRNA is highly expressed in embryonic brown fat and the AKT2 kinase is activated by insulin. *Oncogene*, 1998, 16;2407-2411
- 5 **Altomare D. A., You H., Xiao G. H., Ramos-Nino M. E., Skele K. L., De Rienzo A., Jhanwar S. C., Mossman B. T., Kane A. B., Testa J. R., (2005):** Human and mouse mesotheliomas exhibit elevated AKT/PKB activity, which can be targeted pharmacologically to inhibit tumor cell growth. *Oncogene*, 2002; advanced online publication, 16 May 2005)
- 6 **Aly M. S., Khaled H. M., (2004):** Detection of C-erb B2 gene amplification in bilharzial associated bladder cancer using fluorescence in situ hybridisation. *Urolog Oncol*, 2004;22:448-452
- 7 **Amornphimoltham P., Sriuranpong V., Patel V., Benavides F., Conti C. J., Sauk J., Sausville E. A., Molinolo A. A., Gutkind J. S., (2004):** Persistent activation of the akt pathway in head and neck squamous cell carcinoma: a potential target for UCN-01. *Clin Cancer Res*, 2004;10:4029-4037

- 8 **Amsterdam A., Selveraj N., (1997):** Control of differentiation, transformation and apoptosis in granulosa cell by oncogenes, oncoviruses and tumor suppressor genes. *Endocr R*, 1997;18:435-461
- 9 **Aoki M., Batista O., Bellacosa A., Tsichlis P., Vogt P. K., (1998):** The akt kinase: molecular determinants of oncogenicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998;95:14950-14955
- 10 **Baumann J. G. J., Wiegant J., Borst P., Van Duijn P., (1980):** A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochrome labeled RNA. *Exp Cell Res*, 1980;138:485-490
- 11 **Bellacosa A., de Feo D., Godwin A. K., Bell D. W., Cheng J. Q., Altomare D. A., Wan M., Dubeau L., Scambia G., Maciullo V., (1995):** Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *Int J Cancer*, 1995;64:280-285
- 12 **Bellacosa A., Testa J. R., Staal S. P., Tsichlis P. N., (1991):** A retroviral oncogene, akt, encoding a serine/threonine kinase containing an SH2-like region. *Science*, 1991;254:274-277
- 13 **Bishop J.,(1991):** Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, 1991;64:235-248
- 14 **Bishop J. M., Weinberg R. A., (1996):** Molecular oncology. New York: Scientific American, 1996
- 15 **Björhkolm E. (1980):** Granulosa-cell tumor: A comparison of survival in patients and matched controls. *Am Journal Obstet Gynecol* 1980;138:329-31
- 16 **Björhkolm E. (1980):** Granulosa-cell and Theka-cell tumor. The clinical picture and long term out-come for the Radiumhemmet series. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1980 ; 59:361.
- 17 **Björhkolm E., Silferswärd C., (1981):** Prognostic factors in granulosa cell tumors. *Gynecol Oncology* 1981;11:261-74

- 18 Blumenfeld D., Braly P. S., Ben-Ezra J., Klevecz R. R., (1987):** Tumor DNA content as a prognostic feature in advanced epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*, 1987;27:389-398
- 19 Boggess J.F., Soules M. R., Goff B. A., Greer B. E., Cain J. M., Tamimi H. K., (1997):** Serum inhibin and disease status in women with ovarian granulosa cell tumors. *Gynecol Oncol*, 1997;64:64-69
- 20 Boyd J.,(2003):** Specific keynote: Hereditary ovarian cancer: What we know. *Gynecol Oncol*, 2003;88:8-10
- 21 Brennan P., Babbage J. W., Burgering B. M., Groner B., Reif K., Cantrell D. A., (1997):** Phosphatidylinositol 3-kinase couples the interleukine-2 receptor to the cell cycle regulator E2F: *Immunity*,1997,7(5);679-689
- 22 Briasoulis E., Karavasilis V., Pavlidis N., (1997) :** Megestrol activity in recurrent adult type granulosa cell tumor of the ovary. *Ann Oncol*, 1997;8:811-812
- 23 Brodbeck D., Cron P., Hemmings B. A., (1999):** A human protein kinase B gamma with regulatory phosphorylation sites in the activation loop and in the C-terminal hydrophobic domain. *J Biol Chem*, 1999;274:9133-9136
- 24 Burgering B. M., Coffey P. J., (1995):** Protein kinase B (c-AKT) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature*, 1995;376:599-602
- 25 Cannistra S. A., (1993) :** Cancer of the ovary. *N Engl J Med*, 1993;329:1550-1559
- 26 Case records of the Massachusetts General Hospital:** Weekly clinicopathological exercises- case 10-1995: A 56-year old woman with abdominal pain, anemia, and a pelvic mass. *N engl J Med*, 1995;332:876-881

- 27 Chadha S., Rao B. R., Slotman B. J., van Vroonhoven C. C., van der Kwast T. H., (1993):** An immunohistochemical evaluation of androgen and progesterone receptors in ovarian tumors. *Hum Pathol*, 1993;24:90-95
  
- 28 Cheng J. Q., Godwin A. K., Bellacosa A., Taguchi T., Franke T. F., Hamilton T. C., Tsichlis P. N., Testa J. R., (1992):** AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992;89:9267-9271
  
- 29 Cheng J. Q., Ruggeri B., Klein W. M., Sonoda G., Altomare D. A., Watson D. K., Testa J. R. (1996):** Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996;93:3636-3641
  
- 30 Chen W. S., Xu P. Z., Gottlob K., Chen M. L., Sokol K., Shuyanov T., Rononson I., Weng W., Suzuki R., Tobe K., Kadowaki T., Hay N., (2001):** Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the AKT1 gene. *Genes dev*, 2001;15:2203-2208
  
- 31 Christov K., Vassilev N., (1987):** Flow cytometric analysis of DNA and cell proliferation in ovarian tumors. *Cancer*, 1987;60:121-125
  
- 32 Coffey P. J., Woodgett J. R., (1991):** Molecular cloning and characterization of a novel putative protein-serine kinase related to the camp-dependent and protein kinase c families. *Eur J Biochem*, 1991;201:475-481
  
- 33 Colombo N., (1999):** Management of sex cord-stromal tumors. *Gershenson D. M. Ovarian Cancer*, 1 ed. 1999:417
  
- 34 Colombo N., Sessa C., Landoni F., Sartori E., Pecorelli S., Mangioni C., (1986):** Cisplatin, vinblastine and bleomycin combination chemotherapy in metastatic granulosa cell tumor of the ovary. *Obstet Gynecol*, 1986;67:265-268

- 35 Cronje H. S., Niemand I., Bam R. H., Woodruff J. D., (1999):** Review of the granulosa-theca-cell tumors of the Emil Novak ovarian tumor registry. *Am J Obstet Gynecol*,1999;180:323-327
- 36 Cross D. A., Alessi D. R., Cohen P., Anjelkovic M., Hemmings B. A., (1995):** Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, 1995, 378;785-789
- 37 Dhillon V. S., Aslam M., Husain S. A., (2004):** The contribution of genetic and epigenetic changes in granulosa cell tumors of ovarian origin. *Clin Cancer Res*, 2004;10:5537-5545
- 38 Diebold J., Deisenhofer I., Baretton G. B., Blasenbren S., Suchy B., Schneiderbanger K., Meier W., Haas C. J., Lohrs U., (1996):** Interphase cytogenetic analysis of serous ovarian tumors of low malignant potential: comparison with serous cystadenomas and invasive serous carcinomas. *Lab Invest*, 1996,75;473-485
- 39 Dudenhauser, J. W., Schneider, H. P. G., (1994):** *Frauenheilkunde und Geburtshilfe* 1.Auflage, Berlin, New York: Walter de Gruyter, 1994
- 40 Du Manoir S., Schröck E., Bentz M., Speicher M. R., Joos S., Ried T., Lichter P., Cremer T., (1995):** Quantitative analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry*, 1995;19:27-41
- 41 Du Manoir S., Speicher M. R., Joos S., Schröck E., Popp S., Döhner H., Kovacs G., Robert-Nicoud M., Lichter P., Cremer T., (1993):** Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic hybridization. *Genet*, 1993;90:590-610
- 42 Evans A. T. Gaffey T. A., Malkasian G.D., Annegers J. F., (1980):** Clinicopathological review of 118 granulosa and 82 theca cell tumors. *Obstet. Gynecol* 1980;55:231-238

- 43 Evans M. P., Webb M. J., Gaffey T. A., Katzmann J. A., Suman V. J., Hu T. C., (1995) :** DNA ploidy of ovarian granulosa cell tumors. Lack of correlation between DNA index or proliferative index and outcome in 40 patients. *Cancer*, 1995;75:2295-2298
  
- 44 Fathalla M. F., (1972):** Factors in the causation and incidence of ovarian cancer. *J Obstet Gynecol Surv*, 1972,27;751-768
  
- 45 Fishman A., Kudelka A. P., Tresukosol D., Edwards C. L., Freedman R. S., Kaplan A. L., Girtanner R. E., Kavanagh J. J., (1996):** Leuprolide acetate for treating refractory or persistent ovarian granulosa cell tumor. *J Reprod Med*, 1996;41:393-396
  
- 46 Fletcher J. A., Gibas Z., Donovan K., Perez-Atayde A., Genest D., Morton C. C., Lage J. M., (1991):** Ovarian granulosa-stromal cell tumors are characterized by trisomy 12. *Am J Pathol*, 1991;138:515-520
  
- 47 Fontanelli R., Stefanon B., Raspagliesi F., Kenda R., Tomasic G., Spatti G., Riboldi G., Di Donato P., Pilotti S., De Palo G., (1998):** Adult granulosa cell tumor of the ovary: a clinicopathological study of 35 cases. *Tumori*, 1998,84;60-64
  
- 48 Fox H., Agrawal K., Langley F.A., (1975):** A clinicopathological study of 92 cases of granulosa cell tumor of the ovary with special reference to the factors influencing prognosis. *Cancer* 1975;35:231-241
  
- 49 Franke T. F., Yang S. I., Chan T. O., Datta K., Kazlauskas A., Morrison D. K., Kaplan D. R., Tsichlis P. N., (1995):** The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell*, 1995, 81;727-736
  
- 50 Frausto S. D., Geisler J. P., Fletcher M. S., Sood A. K.,(2004):** Late recurrence of juvenile granulosa cell tumor of the ovary. *Am J Obstet Gynecol*, 2004,191;366.367
  
- 51 Frech M., Andjelkovic M., Ingley E., Reddy K. K., Falck J. R., Hemmings B. A., (1997):** High affinity binding of inositol phosphates and phosphoinositides to the pleckstrin

homology domain of RAC/protein kinase B and their influence on kinase activity. J Biol Chem, 1997, 272;8474-8481

- 52 Fujio Y., Guo K., Mano T., Mitsuuchi Y., Testa J. R., Walsh K., (1999):** Cell cycle withdrawal promotes myogenic induction of Akt, a positive modulator of myocyte survival. Mol Cell Biol, 1999;19:5073-5082
- 53 Fujimoto T., Sakuragi N., Okuyama K., Fujino T., Yamashita K., Yamashiro S., Shimizu M., Fujimoto S., (2001):** Histopathological prognostic factors of adult granulosa cell tumors of the ovary. Acta Obstet Gynecol Scand, 2001;80:1069-1074
- 54 Fuller P. J., Chu S., (2004):** Signalling pathways in the molecular pathogenesis of ovarian granulosa cell tumours. TR Endocrinol Metabol, 2004;15:122-128
- 55 Gall J. G., Pardue M. L., (1969):** Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. Proc Natl Acad Sci USA, 1969;63:278-383
- 56 Gebhart J. B., Roche P. C., Keeney G. L., Lesnick T. G., Podratz K. C., (2000):** Assessment of inhibin and p53 in granulosa cell tumors of the ovary. Gynecol Oncol, 2000;77:232-236
- 57 Gershenson D. M., Copeland L. J., Kavanagh J. J., Stringer C. A., Saul P. B., Wharton J. T., (1987):** Treatment of metastatic stromal tumors of the ovary with cisplatin, doxorubicin and cyclophosphamide. Obstet Gynecol, 1987;70:765-769
- 58 Giuntoli R. L., Celebre J. A., Wu C. H., Wheeler J. E., Minuta J. J., ( 1976):** Androgenetic function of a granulosa cell tumor. Obstet Gynecol, 1976;47:77
- 59 Gorski G. K., McMorrow L. E., Blumstein L., Faasse D., Donaldson M. H., (1992):** Trisomy 14 in two cases of granulosa cell tumor of the ovary. Cancer Genet Cytogenet, 1992;60:202-205

- 60 Graff J. R., Konicek B. W., McNulty A. M., Wang Z., Houck K., Allen S., Paul J. D., Hbaidu A., Goode R. G., Sandusky G. E., Vessella R. L., Neubauer B. L.(2000):** Increased AKT activity contributes to prostate cancer progression by dramatically accelerating tumor growth and diminishing p27 kip1 expression. *J Biol Chem*, 2000, 275:24500-24505
- 61 Gusberg S. B., Kardon P., (1971):** Proliferative endometrial response to theca granulosa cell tumors. *Am J Obstet Gynecol*, 1971;111:633-643
- 62 Haba R., Miki H., Kobayashi S., Ohmori M., (1993):** Combined analysis of flow cytometry and morphometry of ovarian granulosa cell tumor. *Cancer*, 1993;72:3258-3262
- 63 Hahn W. C., Weinberg R. A., (2002):** Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* , 2002;347:1593-1603
- 64 Hahn W. C., Weinberg R. A., (2002):** Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat Rev Cancer*, 2002;2:331-341
- 65 Halperin D., Visscher D. W., Wallis T., Lawrence W. D., (1995):** Evaluation of chromosome 12 copy number in ovarian granulosa cell tumors using interphase cytogenetics. *Int J Gynecol Pathol*, 1997,14:319-323
- 66 Hanada M., Feng J., Hemmings B. A., (2004):** Structure, regulation and function of PKB/AKT- a major therapeutic target. *Biochem Biophys Acta*, 2004;1697:3-16
- 67 Hanahan D., Weinberg R. A.,(2000):** The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000;100:57-70
- 68 Healy D. L., Burger H. G., Mamers P., Jobling T., Bangah M., Quinn M., Grant P., Day A. J., Rome R., Campbell J. J., (1993):** Elevated serum inhibin concentrations in postmenopausal women with ovarian tumors. *N Engl J Med*, 1993;329:1539-1542
- 69 Hennig W., 2001:** Genetik, 3. Auflage, Springer Heidelberg, S. 116, S. 595



- 70 Hildebrant R. H., Rouse R. V., Longacre T. A., (1997):** Value of inhibin in the identification of granulosa cell tumors of the ovary. *Hum Pathol*, 1997;28:1387-1395
- 71 Hines J. F. , Khalifa M. A., Moore J. L., Khalifa M. A., Moore J. L., Fine K. P., Lage J. M., Barnes W. A., (1996):** Recurrent granulosa cell tumor of the ovary 37 years after initial diagnosis: A case report and review of the literature. *Gynecol Oncol*, 1996;60:484-488
- 72 Hunter T., (1997):** Oncoprotein networks. *Cell*, 1997;88:333-346
- 73 Jacobs I., Bast R. C.,(1989):** The CA-125 tumor associated antigen: A review of the literature. *Human Reproduction*, 1989;4:1-12
- 74 Jacoby A. F., Young R. H., Colvin R., Flotte T. J., Preffer F., Scully R. E., Swymer C. M., Bell D. A., (1992):** DNA content in juvenile granulosa cell tumors of the ovary: a study of early and advanced-stage disease. *Gynecol Oncol*, 1992;46:97-103
- 75 James S. R., Downes C. P., Gigg R., Grove S. J., Holmes A. B., Alessi D. R., (1996):** Specific binding of the Akt-1 protein kinase to phosphatidylinositol 3, 4, 5-triphosphate without subsequent activation. *Biochem J*, 1996, 315(Pt 3);709-713
- 76 Jamieson C. H., Alexiadis M., Fuller P. J., (2004):** Expression status and mutational analysis of the ras and B.raf genes in ovarian granulosa cell and epithelial tumors. *Gynecol Oncol*, 2004, 95;603-609
- 77 Jobling T., Mamers P., Healy D. L., MacLachlan V., Burger H. G., Quinn M., Rome R., Day A. J., (1994):** A prospective study of inhibin in granulosa cell tumors of the ovary. *Gynecol Oncol*, 1994;55:285-289
- 78 John H. , Birnstiel M., Jones K., (1969):** RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature*, 1969;223:582-587

- 79 Jones P. F. T., Jakubowicz F. J., Pitossi F. J., Maurer F., Hemming B. A., (1991):** Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991;88:4171-4175
- 80 Jordan N. J., Gee J. M. W., Barrow D., Wakeling A. E., Nicholson R I., (2004):** Increased constitutive activity of PKB/AKT in tamoxifen resistant breast cancer MCF-/cells. *Breast Canc Res Treat*, 2004;87:167-180
- 81 Kallioniemi A., Kallioniemi O. P., Sudar D., Rutovitz D., Gray J. W., Waldmann F., et al., (1992):** Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*, 1992;258:818-821
- 82 Kallioniemi O. P., Punnonen R., Matilla J., Lehtinen M., Koivula T., (1988):** Prognostic significance of DNA index, multiploidy, and S-phase fraction in ovarian cancer. *Cancer*, 1988;61:334-339
- 83 Kandel E. S., Hay N., (1999):** The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase AKT/PKB. *Exp Cell Res*, 1999;253:210-229
- 84 Kappes S., Milde-Langosch K., Kressin P., Passlack B., Dockhorn-Dworniczak B., Rohlke P., Loning T., (1995):** p53 mutations in ovarian tumors, detected by temperature-gradient gel electrophoresis, direct sequencing and immunohistochemistry. *Int J Cancer*, 1995;64:52-59
- 85 Kayisli O. G., Kayisli U. A., Luleci G., Arici A., (2004):** In vivo and in vitro regulation of act activation in human endometrial cells is estrogen dependent. *Biolog Reprod*, 2004;71:714-721
- 86 Kelly, K.,(1985):** Growth factors short circuited. *Nature*, 1985;317:390
- 87 King L. A., Okagaki T., Gallup D. G., Twiggs L. B., Messing M. J., Carson L. F., (1996):** Mitotic count, nuclear atypia, and immunohistochemical determination of ki-67, c-

myc, p21-ras, c-erbB2, and p53 expression in granulosa cell tumors of the ovary: mitotic count and ki-67 are indicators of poor prognosis. *Gynecol oncol*, 1996;61:227-232

- 88 Klemi P. J., Joensu H., Salmi T., (1990):** Prognostic value of flow cytometric DNA content analysis in granulosa cell tumor of the ovary. *Cancer*, 1990;65:1189-1193
- 89 Kohn A. D., Kovacina K. S., Roth R. A., (1995):** Insulin stimulates the kinase activity of RAC-PK, a pleckstrin homology domain containing ser/thr kinase. *Embo J*, 1995, 14;4288-4295
- 90 Langer P. R., Waldrop A. A., Ward D. A., (1981):** Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci*, 1981;78:6633-6637
- 91 Lappohn R. E. , Burger H. G., Bouma J., Bangah M., Krahns M., de Bruijn H. W., (1989):** Inhibin as a marker for granulosa cell tumors. *N Engl J Med*, 1989;321:790-793
- 92 Lauszus F. F., Petersen A. C., Greisen J., Jacobsen A., (2001):** Granulosa cell tumor of the ovary: A population-based study of 37 women with stage I disease. *Gynecol Oncol*, 2001;81:456-460
- 93 Lee I. W., Levin W., Chapman W., Goldberg R. E., Murphy K. J., Milosevic M., (1999):** Radiotherapy for the treatment of metastatic granulosa cell tumor in the mediastinum: A case report. *Gynecol Oncol*, 1999;73:455-460
- 94 Lin Y. S., Eng H. L., Jan Y. J., Lee H. S., Ho W. L., Liou C. P., Lee W. Y., Tzeng C. C., (2005):** Molecular cytogenetics of ovarian granulosa cell tumors by comparative genomic hybridisation. *Gynecol Oncol*, 2005;97:68-73
- 95 Lindgren V., Waggoner S., Rotmensch J., (1996):** Monosomy 22 in two ovarian granulosa cell tumors. *Cancer Genet Cytogenet*, 1996;89:93-97

- 96 Malik S. N., Brattain M., Ghosh P. M., Troyer D. A., Prihoda T., Bedolla R., Kreisberg J. I., (2002):** Immunohistochemical demonstration of phospho-Akt in high Gleason grade prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 2002;8:1168-1171
- 97 Malmstrom H., Hogberg T., Risberg B., Simonsen E., (1994):** Granulosa cell tumors of the ovary: Prognostic factors and outcome. *Gynecol Oncol* 1994;52:50-55
- 98 Mandal M., Kim S., Younes M. N., El-Nagger A. K., Mills G. B., Myers J. N., (2005):** The Akt inhibitor KP372-I suppresses Akt activity and cell proliferation and induces apoptosis in Thyroid cancer cells. *Brit J Cancer*, 2005;92:1899-1905
- 99 Martikainen H., Penttinen J., Huhtaniemi I., Kauppila A., (1989):** Gonadotropin-releasing hormone agonist analog therapy effective in ovarian granulosa cell malignancy. *Gynecol Oncol*, 1989;35:406-408
- 100 Mayr D., Kaltz-Wittmer C., Arbogast S., Amann G., Aust D. E., Diebold J., (2002):** Characteristic pattern of genetic aberrations in ovarian granulosa cell tumors. *Mod Pathol*, 2002;15:951-957
- 101 Menard S., Casalini P., Campiglio M., Pupa S., Agresti R., Tagliabue E., (2001):** HER2neu overexpression in various tumor types, focussing on its relationship to the development of invasive breast cancer. *Ann Oncol*, 2001;12(suppl 1):15-19
- 102 Michell B., (1984):** Oncogenes and inositol lipids. *Nature*, 1984;308:770
- 103 Miller B. E., Barron B. A., Dockter M. E., Delmore J. E., Silva E. G., Gershenson D. M., (2001):** Parameters of differentiation and proliferation in adult granulosa cell tumors of the ovary. *Cancer Detec Prev*, 2001;25:48-54
- 104 Miller B. E., Barron B. A., Wan J. Y., Delmore J. E., Silva E. G., Gershenson D. M., (1997):** Prognostic factors in adult granulosa cell tumors of the ovary. *Cancer*, 1997;79:1951-1955

**105 Namiq A. L., Persons D. L.,**

**LETTER TO THE EDITOR (2005):** Monosomy 22 and trisomy 14 in a granulosa cell tumor metastatic to the lung 20 years after removal of the primary tumor. *Canc Genet Cytogenet*, 2005;159:192-193

**106 Nicholson K. M. and Anderson N. G. (2002):** The protein kinase B/AKT signalling pathway in human malignancy. *Cell Sign*, 2002;14:381-395

**107 Ohel G., Kaneti H., Schenker J. G., (1983):** Granulosa cell tumors in Israel: A study of 172 cases. *Gynecol Oncol* 1983;15:278-286

**108 Opalka B., Schütt P., (2005):** A new Act in Tumor Therapy? Targeting the PIK3/AKT Kinase Pathway as Novel Therapy Option for Treatment of Neoplastic Disease. *Tumordiagn u Ther*, 2005;26:105-112

**109 Pankratz E., Boyes D. A., White G. W., Galliford B. W., Fairey R. N., Benedet J. L., (1978):** Granulosa cell tumors: A clinical review of 61 cases. *Obstet Gynecol*, 1978;52: 718-723

**110 Pauletti G., Dandekar S., Rong H. M., Ramos L., Peng H., Sehadri R., Slamon D. J., (2000):** Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: A direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Clin Oncol*, 2000;18:3651-3664

**111 Peterson R. T., Schreiber S. L., (1999):** Kinase phosphorylation: Keeping it all in the family. *Curr Biol*, 1999, 9;521-524

**112 Pfeleiderer A., Breckwoldt M., Martius G., (2002):** Gynäkologie und Geburtshilfe, 4. Auflage, Stuttgart; New York: Thieme, 2001

**113 Ramus S. J., Pharoah P. D., Harrington P., Pye C., Werness B., Bobrow L., Ayhan A., Wells D., Fishman A., Gore M., Di Cioccio R. A., Piver M. S., Whittemore A. S., Ponder B. A., Gayther S. A., (2003):** BRCA 1/2 Mutation Status Influences Somatic

genetic Progression in Inherited and Sporadic Epithelial Ovarian Cancer Cases. *Canc Research* 2003;63:417-423

- 114 Reifemberger G., Reifemberger J, Ichimura K., Meltzer P. S., Collins P. V., (1994):** Amplifications of multiple genes from chromosomal region 12q13-14 in human malignant gliomas: preliminary mapping of the amplicons show preferential involvement of CDK4, SAS, and MDM2. *Cancer Res*, 1994;54:4299-4303
- 115 Remmele W., (Hrsg) (1997):** Pathologie, Bd 4. Weibliches Genitale; Mamma; Pathologie der Schwangerschaft, der Plazenta und des Neugeborenen; Infektionskrankheiten des Fetus und des Neugeborenen; Tumoren des Kindesalters; Endokrine Organe, 2. neubearb. Aufl., Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, London, Mailand, Paris, Springer, 1997
- 116 Rey R.A., Lhomme C., Marcillac I., Lahlou N., Duvillard P., Josso N., Bidart J. M., (1996):** Antimullerian hormone as a serum marker of granulosa cell tumor of the ovary : Comparative study with serum alpha inhibin and estradiol. *Am J Obstet Gynecol*, 1996;175:958-965
- 117 Ried T., Liyanage M., Du Manoir S., Heselmeyer K., Auer G., Macville M., Schröck E., (1997):** Tumor cytogenetics revisited: comparative genomic hybridization and spectral karyotyping. *J. Mol Med*, 1997;75:801-814
- 118 Ried T., Petersen I., Holtgreve-Grez H., Speicher m. R., Schröck E., Du Manoir S., Cremer T., (1994):** Mapping of multiple DNA gains and losses in primary small cell lung carcinomas by comparative genomic hybridization. *Cancer Res*, 1994;54:1801-1806
- 119 Rodenburg J., Cornelisse C. J., Heintz P. A., Hermans J., Fleuren G. J., (1987):** Tumor ploidy as a major prognostic factor in advanced ovarian cancer. *Cancer*, 1987;59:317-323
- 120 Rokitansky C. V. (1859):** Über Abnormalitäten des Corpus Luteum. *Wien Med Ztc* 1859;253-254

- 121 Roush G. R., El-Naggar A. K., Abdul-Karim F. W. (1995):** Granulosa cell tumor of ovary: a clinicopathologic and flow cytometric DNA analysis. *Gynecol Oncol*, 1995;56:1189-1193
- 122 Ruggeri B. A., Huang L., Wood M., Cheng J. Q., Testa J. R., (1998):** Amplification and overexpression of the AKT2 oncogene in a subset of human pancreatic ductal adenocarcinomas. *Mol Carcinog*, 1998;21:81-86
- 123 Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R., (1977):** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology*, 1992, 24;104-108
- 124 Savage P., Constenla D., Fisher C., Shepherd J. H., Barton D. P., Blake P., Gore M. E., (1998):** Granulosa cell tumors of the ovary: Demographics, survival and the management of advanced disease. *Clin Oncol ( R Coll Radiol)*, 1998;10:242-245
- 125 Schuijjer M., Berns E. M. J. J.; (2003):** Tp53 and ovarian cancer. *Hum Mutat*, 2003;21:285-291
- 126 Schumer S. T. Cannistra S. A., ( 2003) :** Granulosa Cell Tumor of the Ovary. *Journal of Clinical Oncology*, 2003; Vol 21, No 6:1180-1189
- 127 Scully R. E. (1962):** Sex cord mesenchyme tumors. Pathologic classifications and its relation to prognosis and treatment. Gentil F. *Ovarian cancer*, vol II. Heidelberg: Springer-Verlag 1962
- 128 Staal S., (1987):** Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: Amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1987;84:5034-5037
- 129 Staal, S. P., Huebner K., Croce C. M., Parsa N. Z., Testa J. R., (1988):** The AKT1 proto-onkogene maps to human chromosome 14, band q32. *Genomics*, 1988;2:96-98

- 130 Stambolic V., Suzuki A., de la Pompa J. L., Brothers G. M., Mirtsos C., Sasaki T., Ruland J., Penninger J. M., Siderovski D. P., Mak T. W., (1998):** Negative regulation of PKB/AKT dependent cell survival by the tumor suppressor gene PTEN. *Cell*, 1998;95:29-39
- 131 Stenwig J. T., Hazekamp J. T., Beecham J. B., (1979):** Granulosa cell tumors of the ovary: A clinicopathological study of 118 cases with long-term followup. *Gynecol Oncol*, 1979; 7:136-152
- 132 Stephens L., Anderson K., Stokoe D., Erdjument-Bromage H., Painter G. F., Holmes A. B., Gaffney P. R., Reese C. B., McCormick F., Tempst P., Coadwell J., Hawkins P. T., (1998):** Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3, 4, 5-triphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science*, 1998, 279;710-714
- 133 Suh K. S., Silverberg S. G., Rhame J. G., Wilkinson D. S., (1990):** Granulosa cell tumor of the ovary. *Arch Pathol Lab Med*, 1990;114:496-501
- 134 Sun M., Wang G., Pagica J. E., Feldmann R. I., Yuan Z. Q., Ma X. L., Shelley S. A., Jove R., Tsihchlis P. N., Nicosia S. V., Cheng J. Q., (2001):** AKT 1/ PKB  $\alpha$  kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells. *Am J Pathol*, 2001;159:431-437
- 135 Tanyi J., Rigo J., Csapo Z., Szentirmay Z., (1999):** Trisomy 12 in juvenile granulosa cell tumor of the ovary during pregnancy. *J Reprod Med*, 1999;44:826-832
- 136 The Cancer and steroid Hormone Study of the Centers for Disease control and the national institute of Child health and Human development ( 1987):** The reduction in risk of ovarian cancer associated with oral contraceptive use. *N Engl J Med* 1987;316:650-655
- 137 Thompson F.H., Emerson J., Alberts D., Liu Y., Guan X. Y., Burgess A., Fox S., Taetle R., Weinstein R., Makar R., Powell D., Trent J., (1994):** Clonal chromosomal abnormalities in 54 cases of ovarian carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 1994;73:33-45



- 138 Thompson F. H., Nelson M. A., Trent J. M., Guan X., Liu Y., Yang J., Emerson J., Adair L., Wymer J., Balfour C., Massey K., Weinstein R., Alberts D. S., Taetle R., (1996):** Amplification of 19q13.1-q13.2 sequences in ovarian cancer G-band, FiSH, and molecular studies, *Cancer Genet Cytogenet*, 1996;87:55-62
- 139 Van den Berg-Bakker C. A. M., Hagemeijer A., Franken-Postma E. M., Smit V. T. H. B. M., Kuppen P.J. K., van Ravenswaay Claasen H. H., Cornelisse C. J., Schrier P. I., (1993):** Establishment and characterization of 7 ovarian carcinoma cell lines and one granulosa tumor cell line: growth features and cytogenetics. *Int J Cancer*, 1993;53:613-620
- 140 Van den Berghe I., Dal Cin P., De Groef K., Michielssen P., Van den Berghe H.,(1999):** Monosomy 22 and trisomy 14 may be early events in the tumorigenesis of adult granulosa cell tumor. *Cancer Genet Cytogenet*, 1999;112:46-48
- 141 Vanhaesbroeck B., Alessi D. R., (2000):** The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J*, 2000;346:561-576
- 142 Waldmann V., (2002):** Are mutations of protein kinase b (PKB/AKT) involved in development and progression of human skin tumors?. *Z Hautkr, H+G*, 2002;77:64-69
- 143 Walker K. S., Deak M., Paterson A., Hudson K., Cohen P., Alessi D. R., (1998):** Activation of protein kinase B beta and gamma isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in vitro: comparison with protein kinase b alpha. *Biochem J*, 1998;331:299-308
- 144 Whang Y. E., Wu X., Suzuki H., Reiter R. E., Tran C., Vesella R. L., Said J. W., Isaacs W. B., Sawyers C. L., (1998):** Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC! In advanced human prostate cancer through loss of expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998;95:5246-5250
- 145 Willemsen W., Kruitwagen R., Bastiaans B., Hanselaar T., Rolland R.,(1993):** Ovarian stimulation and granulosa cell tumor. *Lancet* 1993;341:986-988

- 146 Wolf J. K., Mullen J., Eifel P. J., Burke T. W., Levenback C., Gershenson D. M. , (1999):** Radiation treatment of advanced or recurrent granulosa cell tumor of the ovary. *Gynecol Oncol*, 1999;73:35-41
- 147 Wu Y., Soslow R. A., Marshall D. S., Leitao M., Chen B., (2004):** Her-2/neu expression and amplification in early stage ovarian surface epithelial neoplasms. *Gynecol Oncol*, 2004;93:570-575
- 148 Young R.H., Scully R.E., (1994):** Sex cord stromal, steroid cell and other ovarian tumors with endocrine, paraendocrine, and neoplastic manifestations. Kurmann R. J. Blaustein, *pathology of the Female Genital Tract Chapter 19*, 4 ed. Springer, 1994: 783-847
- 149 Young R., Dickerson G., Scully R., (1984):** Juvenile granulosa cell tumor of the ovary: a clinicopathological analysis of 125 cases. *Am J Surg Pathol*, 1984;8:575-596
- 150 Zambetti M., Escobedo A., Pilotti S., De Palo G., (1990):** Cisplatin/vinblastine/bleomycin combination chemotherapy in advanced or recurrent granulosa cell tumors of the ovary. *Gynecol Onco*, 1990;36:317-320
- 151 Zinda M. J., Johnson M. A., Paul J. D., Horn C., Konicek B. W., Lu Z. H., Sandusky G., Thomas J. E., Neubauer B. L., Lai M. T., Graft J. R., (2001):** AKT 1, 2 and 3 are expressed in both normal and tumor tissue of lung, breast, prostate and colon. *Clin Cancer Res*, 2001;7:2475-2479

## VII. ANHANG zu Kapitel II. MATERIAL UND METHODEN

### VERWENDETE REAGENTIEN, CHEMIKALIEN und GERÄTEN

- zur Vermehrung und Isolierung der BAC-DNA ( siehe **Kap. II.3.3.**)

LB-Agar	(Fluka, Bruchs, Switzerland, 61746)
Chloramphenicol	(Roth, Karlsruhe, 3886.1)
LB-Broth	(Fluka, Bruchs, Switzerland 61748)
NucleoBond BAC 100 Kit	(Macherey und Nagel, Düren, 740579)
Isopropanol	(Merck, Darmstadt)
EtOH 70%.	(Merck, Darmstadt)

- zur Agarosegelelektrophorese der DNA ( siehe **Kap. II.3.4.2.**)

Agarose	(BioRad, Hercules, CA, U.S.A.)
TRIS Base	(Sigma-Aldrich, Bruchs, Switzerland)
Borsäure	(Merck, Darmstadt)
Essigsäure	(Merck, Darmstadt)
Aqua bidest.	(Kerndl, Weißenfeld)
EDTA	(Sigma-Aldrich, Bruchs, Switzerland)
NaOH-Pellets	(Merck, Darmstadt)
StandardMarker 1	(Eurogentec, Seraign, Belgium)
Ethidiumbromid	(Merck, Darmstadt)

- zum Sequenzieren der DNA ( siehe **Kap. II.3.5.**)

Big Dye V.1.1. Sequencing Kit	(Applied Biosystems.)
Aquq bidest.	(Kerndl, Weißenfeld)

Thermocycler TC 480	(Perkin Elmer, Foster City, CA, U.S.A.)
ABI PRISM 310 Genetic Analyzer	(Perkin Elmer, Foster City, CA, U.S.A.)

- zum **Markieren der Sonden-DNA mittels Nick-Translation** (siehe **Kap. II.3.6.** )

DIG-Nick-Translation Mix	(Roche, Mannheim, Germany)
Aqua bidest.	(Kerndl, Weißenfeld)
EDTA 0,5M	(Merck, Darmstadt)

- zur **Vorbereitung der Präparate zur Hybridisierung** (siehe **Kap. II.4.**)

Xylol	(Merck, Darmstadt)
EtOH abs.	(Merck, Darmstadt)
EtOH 96%	(Merck, Darmstadt)
EtOH 70%	(Merck, Darmstadt)
Aqua bidest	(Fa. Kerndl, Weißenfeld)
TRS6	(DAKO, Carpinteria, CA, U.S.A.)
Pepsin	(Sigma Aldrich, Steinham, Germany)
N HCl	(Merck, Darmstadt)
HCl	(Merck, Darmstadt)
NaOH Pellets	(Merck, Darmstadt)
Paraformaldehyd	(Merck, Darmstadt)

- zur **In situ Hybridisierung** (siehe **Kap. II.5.**)

Hybridisierungsmix	(DAKO, Carpinteria, CA, U.S.A.)
Fixogum	(Marabu, Tamm)

- zum **Stringenten Waschen und Nachweis der Hybridisierung** (siehe **Kap. II.5.3.**)

NaCl	(Merck, Darmstadt)
Na 3 Citratdihydrat	(Merck, Darmstadt)
Tween 20	(Sigma Aldrich, Steinham, Germany)
NEN-Blocking	(Perkin Elmer, Foster City, CA, U.S.A.)
TRIS-HCl	(Sigma Aldrich, Bruchs, Switzerland)
TRIS-Base	(Sigma Aldrich, Bruchs, Switzerland)
Dako-Verdünnungsmedium	(DAKO, Carpinteria, CA, U.S.A.)
Anti-Digoxigenin Rhodamin	(Roche, Mannheim, Germany)
Vectashield Mounting Medium	(Vector, Burlingham, U.S.A.)
DAPI	(Sigma Aldrich, Bruchs, Switzerland)

## VII. LEBENSLAUF

Name	Christina Horvath
Geburtsdatum	17. 03. 1978
Geburtsort	München
Staatsangehörigkeit	Britisch
Familienstand	ledig
Eltern	Janos Horvath und Judith Horvath

### Schul Ausbildung

1984 - 1988	Grundschule an der Ichostrasse, München
1988 - 1997	Theodolindengymnasium, München
06/1997	Abitur

### Studium

11/1997 - 04/2004	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians Universität, München
03/2000	Physikum
03/2001	1.Staatsexamen
03/2003	2.Staatsexamen
04/2004	3.Staatsexamen

### Praktisches Jahr

04 - 08/2003	Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie der Universität München
08 - 09/2003	Städt.Krankenhaus München Neuperlach, Abteilung für Chirurgie
10 - 11/2003	Neurochirurgische Klinik des Universitätsspitals Zürich, Schweiz
12/2003 - 03/2004	Medizinische Klinik des Universitätsspitals Zürich, Schweiz

### Hospitation

06/05-8/05	Universitätsaugenklinik an der Mathildenstrasse der LMU, München
------------	--

### Ärztin in Weiterbildung

11/05- aktuell	Universitätsaugenklinik des Inselspitals Bern, Schweiz
----------------	--

## **IX. DANKSAGUNG**

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med Udo Löhrs bedanken, der mich als Doktorandin an seinem Institut aufgenommen hat und mir somit die Möglichkeit zu dieser Arbeit bot.

Ganz besonderen Dank an Frau PD Dr. med Doris Mayr für die hervorragende Betreuung und Unterstützung.

Herzlichen Dank auch an Herrn Prof. Dr. med Joachim Diebold für seine Unterstützung.

Ebenso ein herzliches Dankeschön an Frau Astrid Hirschmann für die hervorragende Betreuung des praktischen Teils.

Vielen Dank auch an alle anderen damaligen und jetzigen Mitarbeitern des Instituts, die mir stets hilfsbereit zur Seite standen und somit diese Arbeit ermöglicht haben.

Auch meiner Familie gebührt ein Herzliches Dankeschön für Ihre Unterstützung.











